

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDSON JOSÉ MAZAROTTO



**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS EM
SEMENTES DE PEROBA ROSA (*Aspidosperma polyneuron*)**

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDSON JOSÉ MAZAROTTO

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS EM
SEMENTES DE PEROBA ROSA (*Aspidosperma polyneuron*)**

CURITIBA

2016

EDSON JOSÉ MAZAROTTO

**DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS EM
SEMENTES DE PEROBA ROSA (*Aspidosperma polyneuron*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel.

Coorientador:
Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos.

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Mazarotto, Edson José

Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*). / Edson José Mazarotto. – Curitiba, 2016.

82 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel

Co-orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Sementes - Patologia. 2. Sementes - Fungos. 3. Fungos endófitos I. Título. II. Pimentel, Ida Chapaval. III. Santos, Álvaro Figueredo. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (22. ed.) 579.53



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE FUNGOS
EM SEMENTES DE PEROBA ROSA (*Aspidosperma polyneuron*)**

por

Edson José Mazarotto

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof^a. Dr^a. Ida Chapaval Pimentel – Presidente


Prof^a. Dr^a. Lucimeris Ruaro


Dr. Celso Garcia Auer

Curitiba, 19 de fevereiro de 2016.

Aos meus queridos pais,

Rosangela e Edson

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, especialmente:

À Prof^a Dr^a. Ida Chapaval Pimentel, pela orientação, confiança, apoio, paciência e conselhos valiosos. Não tenho palavras para expressar meu profundo respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos, cuja co-orientação, disposição, apoio, confiança e amizade, tornaram essa caminhada mais fácil.

À Prof^a Dr^a. Daniela Cleide Azevedo de Abreu pelo fornecimento das sementes e pelas orientações nos testes de qualidade fisiológica.

Ao Prof. Dr. Celso Garcia Auer pelos conselhos valiosos e agradável convivência.

Ao Adilson pela disponibilidade e auxílio nos testes conduzidos no Laboratório de Sementes Florestais.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas: Heloise, Flávia, Ana Lúcia, Thiago, Géssica, Caroline, Davi, Heloisa, Etienne e Pedro, por toda ajuda, amizade e momentos de descontração.

Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná (LabMicro): Carol, Rafaela, Isabela, Andressa, Viviana, Jason, Germana, Gheniffer, Patrícia, Mariana, Alex, pela disposição e contribuições sempre que possível.

Aos amigos do LabNefro, Paulo César e Giane pela amizade e companheirismo nesta árdua caminhada.

Ao Departamento de Patologia Básica e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná, por todo apoio, incentivo e paciência;

Aos meus pais, pela minha formação, apoio, carinho, confiança e incentivo em todos os momentos.

À todos os meus amigos e familiares, por tornarem meus dias mais felizes.

À minha querida Gêssica, pelo carinho, companheirismo, compreensão, grande incentivo e todo apoio para a redação deste trabalho.

À secretária do Programa de Pós-graduação, Luciana Marques, por sua disponibilidade em auxiliar em todas as questões administrativas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

EPÍGRAFE

Não faças do amanhã, o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.
Teus passos ficaram.

Olhes para trás... Mas vá em frente
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

RESUMO

A peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) é uma espécie florestal nativa da Floresta Estacional Semidecidual, que encontra-se ameaçada de extinção devido à intensa exploração predatória. Com a intensificação da procura por sementes, surge a necessidade de ampliar os conhecimentos sobre a qualidade das sementes de espécies florestais nativas. Frente a isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de dez lotes de sementes de peroba rosa, identificando e avaliando fungos que são transmitidos pelas sementes e que possam causar danos à germinação e desenvolvimento das plantas. Foram utilizadas sementes oriundas de quatro regiões do Paraná (Oeste, Sudoeste, Centro-Sul e Noroeste). Para a germinação e vigor foram realizadas seis repetições de 25 sementes em rolos de papel, mantidas em germinador a 25°C por 26 dias com luz contínua. Os parâmetros de vigor avaliados foram a primeira contagem com 12 dias, índice de velocidade de germinação e comprimento de parte aérea e raiz. As análises sanitárias consistiram na detecção de fungos endofíticos e epifíticos, a qual requer níveis diferentes de desinfestação prévia das sementes. Para a detecção de fungos endofíticos (álcool 70% - 1 minuto; hipoclorito de sódio 1% - 4 minutos; álcool 70% - 30 segundos) e epifíticos (álcool 70% - 30 segundos; hipoclorito de sódio 1% - 1 minuto) foi utilizado meio de batata-dextrose-água (BDA) e meio seletivo de *Fusarium* (MSF). O material foi incubado a 20 °C, fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro, por sete dias. Em seguida, determinou-se a incidência (%) dos fungos. Para a transmissão, as sementes não desinfestadas foram semeadas em vermiculita. Avaliou-se a presença de sintomas nas plântulas. Aos 60 dias após a semeadura, as sementes não germinadas foram removidas e colocadas em câmara úmida para observação. Quanto à patogenicidade o teste foi realizado em mudas de peroba rosa, com ferimentos prévios nas folhas e inoculou-se um disco de meio BDA com micélio em crescimento ativo. As mudas foram colocadas em câmara úmida por 72 horas e mantidas por 30 dias em casa de vegetação. Os isolados de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. selecionados foram identificados por meio de sequências das regiões ITS1-5,8S e ITS2 do DNA ribossomal e região parcial do fator de elongação 1-alpha. A germinação das sementes de peroba rosa variou de 9,3% a 60%. *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. foram os fungos fitopatogênicos encontrados como epífitos nas sementes de peroba rosa, com incidência entre 52 e 25%, respectivamente. Como endófitos apresentaram valores entre 5 e 65%, respectivamente. Houve transmissão de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. das sementes para as plântulas causando necrose de raízes e cotilédones. 27 isolados de *Fusarium* spp. e 26 de um total de 32 isolados de *Phomopsis* spp. foram patogênicos. Por meio das características morfológicas e moleculares foram identificadas sete espécies de *Fusarium* – *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium pseudocircinatum* e *Fusarium subglutinans*, associadas às sementes de peroba rosa. Quanto à *Phomopsis* spp., foram identificadas duas espécies: *Diaporthe paranensis* e *Diaporthe oxe*.

Palavras-chave: Patologia de sementes, sementes florestais nativas, fungos endofíticos.

ABSTRACT

The peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron*) is a forest specie, native from the semideciduous forest, which is threatened of extinction due the intense predatory exploitation. The increasing on the demand for seeds arises the need to increase knowledge about the quality of seeds of native forest species. Based on that, the aim of this study was to check the sanitary quality and physiological of ten peroba rosa seed lots, identifying and assessing fungi what are transmitted for seeds and that can cause damage to the germination and development of plants. Ten lots of seeds from four regions of Paraná (West, Southwest, South Central and Northwest) were used. For germination and vigor, six repetitions of 25 seeds were performed in rolls of paper, maintained in germinator at 25 °C for 26 days with continuous light. The vigor parameters evaluated were the first count with 12 days, germination speed index and length of shoot and root. The sanitary analysis consisted in detecting endophytic and epiphytic fungi, which requires different levels of prior disinfection of the seeds. For detection of endophytic fungi (70% alcohol - 1 minute; 1% sodium hypochlorite - 4 minutes; 70% alcohol - 30 seconds) and epiphytic (70% alcohol - 30 seconds; 1% sodium hypochlorite - 1 minute) potato-dextrose-agar (PDA) and *Fusarium* selective medium (MSF) were used. The material was incubated at 20 °C, with photoperiod of 12 hours light / 12 hours dark, for seven days. Then, it was determined the incidence (%) of fungi. For the transmission test, the non-disinfested seeds were sown in vermiculite. The presence of symptoms in seedlings was evaluated. At 60 days after sowing, the non-germinated seeds were removed and placed in a humid chamber for observation. The pathogenicity test was performed in seedlings of peroba rosa, with previous injuries in the leaves where a disk of PDA with mycellium in active growth was inoculated. The seedlings were placed in humid chamber for 72 hours and maintained for 30 days in a greenhouse. The isolates of *Fusarium* spp. and *Phomopsis* spp. selected were identified by sequences of rDNA regions ITS1-5,8S and ITS2 and partial region of the elongation factor 1-alpha. The germination of seeds of peroba rosa ranged from 9.3% to 60%. *Fusarium* spp. and *Phomopsis* spp. were the phytopathogenic fungi found as epiphytes in peroba rosa, with incidence between 52 and 25%, respectively. As endophytes, they showed values between 5 and 65%, respectively. There was transmission of *Fusarium* spp. and *Phomopsis* spp. from the seeds to seedlings causing necrosis in roots and cotyledons. 27 isolates of *Fusarium* spp. and only 26 out of 32 isolates of *Phomopsis* spp. were pathogenic. Through morphological and molecular and characteristics, seven *Fusarium* species were identified – *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium pseudocircinatum* and *Fusarium subglutinans*, all associated with peroba rosa seeds. Regarding the *Phomopsis* spp., two species were identified: *Diaporthe paranensis* and *Diaporthe oxe*.

Keywords: Seed pathology, native forest seeds, endophytic fungi.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: TESTE DE DETECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS. A - PLACA COM SEMENTES DESINFESTADAS; B - CÂMARA DE INCUBAÇÃO; C – SEMENTES COLONIZADAS POR <i>Phomopsis</i> sp.; D - SEMENTES COLONIZADAS POR <i>Fusarium</i> sp.	40
FIGURA 2: PERCENTUAL DE EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS NORMAIS E SINTOMÁTICAS E SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA, AOS 70 DIAS DA SEMEADURA NO TESTE DE TRANSMISSÃO DE FUNGOS PARA SEMENTES.....	44
FIGURA 3: PLÂNTULAS DE PEROBA ROSA EMERGIDAS NO TESTE DE TRANSMISSÃO DE FUNGOS PARA SEMENTES. A - EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS; B - MANCHAS ESCURAS NOS COTILÉDONES; C - MANCHAS ESCURAS NOS COTILÉDONES E APODRECIMENTO DE RAÍZES; D – SINAIS (CRESCIMENTO MICELIAL ESBRANQUIÇADO) DE <i>Fusarium</i> sp. EM LESÃO NOS COTILÉDONES.....	44
FIGURA 4: TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE PEROBA ROSA. A - TOMBAMENTO DE PLÂNTULA; B E C - PLÂNTULAS MORTAS; DETECÇÃO DE <i>Fusarium</i> spp. EM PLÂNTULAS COM SINTOMAS EM MEIO BDA.....	47
FIGURA 5: PATOGENICIDADE EM MUDAS. A - MONTAGEM DE CÂMARA ÚMIDA; B - MUDAS INOCULADAS; C - FOLHA SADIA; D - FOLHA COM INJÚRIA SEM SINTOMA; E - FOLHA COM ESCURECIMENTO DO LIMBO; F - SINAIS DO FUNGO.	49
FIGURA 6: CONÍDIOS. A - MACRO E MICROCONÍDIOS DE <i>Fusarium solani</i> , B - MACRO E MICROCONÍDIOS DE <i>Fusarium oxysporum</i> ; C - MACRO E MICROCONÍDIOS DE <i>Fusarium subglutinans</i>	57
FIGURA 7: CONÍDIOS. A - MACRO E MICROCONÍDIOS DE <i>Fusarium pseudocircinatum</i> , B - MACRO E MICROCONÍDIOS DE <i>Fusarium verticillioides</i> ; C - MACROCONÍDIOS DE <i>Fusarium equiseti</i>	58

FIGURA 8: CONÍDIOS. A - MICROCONÍDIOS DE <i>Fusarium fujikuroi</i> , B – CLAMIDÓSPORO INTERCALAR, FIÁLIDES CURTAS E MICROCONÍDIOS DE <i>Fusarium oxysporum</i> .	59
FIGURA 9: DIÂMETRO MÉDIO (mm) DAS COLÔNIAS DE <i>Phomopsis</i> spp. EM MEIO BDA, APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, a 24°C.	60
FIGURA 10: COLÔNIA DE <i>Phomopsis</i> spp. A - ALFA E BETA CONÍDIOS; B – PICNÍDIOS.	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PROCEDÊNCIA DOS LOTES DE SEMENTES DE PEROBA ROSA COLETADAS, NAS REGIÕES E MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARANÁ ...	27
TABELA 2: GERMINAÇÃO (G), PRIMEIRA CONTAGEM (PC), ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), COMPRIMENTO DE PARTE AÉREA (CA) E COMPRIMENTO DE RADÍCULA (CR) OBTIDOS NOS TESTES DE GERMINAÇÃO E VIGOR PARA PEROBA ROSA AOS 26 DIAS, A 25 °C.	39
TABELA 3: INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS (%) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA DETECTADOS EM MEIO BDA, A 20 °C, 12 HORAS DE FOTOFASE, AOS 7 DIAS.....	40
TABELA 4: INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS (%) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA DETECTADOS EM MEIO SELETIVO (MSF), A 20 °C, 12 HORAS DE FOTOFASE, AOS 7 DIAS.	41
TABELA 5: INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EPIFÍTICOS (%) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA DETECTADOS EM MEIO SELETIVO (MSF), A 20 °C, 12 HORAS DE FOTOFASE, AOS 7 DIAS.	42
TABELA 6: INCIDÊNCIA MÉDIA (%) DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS - <i>Fusarium</i> spp. e <i>Phomopsis</i> spp. - NOS TESTES DE BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA) E MEIO SELETIVO (MSF) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA.	43
TABELA 7: INCIDÊNCIA (%) de <i>Fusarium</i> spp. E <i>Phomopsis</i> spp. EM SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA, NO TESTE DE TRANSMISSÃO DE FUNGOS PARA SEMENTES.....	45
TABELA 8: PERCENTUAL DE EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS SEM SINTOMAS, COM SINTOMAS E SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA, AOS 56 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DAS SEMENTES COM <i>Fusarium</i> spp.	46
TABELA 9: PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DE <i>Fusarium</i> spp. NAS PLÂNTULAS COM SINTOMAS E SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA ORIUNDAS DO TESTE DE PATOGENICIDADE.....	47

TABELA 10: PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. EM MUDAS DE PEROBA ROSA, UTILIZANDO INOCULAÇÃO DE DISCO DE BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO EM FOLHAS.....	50
TABELA 11: PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> spp. EM MUDAS DE PEROBA ROSA, UTILIZANDO INOCULAÇÃO DE DISCO DE BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO EM FOLHAS.....	51
TABELA 12: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE PEROBA ROSA, FORMADOS EM MEIO FCA, A 24 °C POR 21 DIAS.....	53
TABELA 13: TAMANHO MÉDIO (µm) DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS DAS ESPÉCIES DE <i>Fusarium</i> OBTIDAS EM SEMENTES DE PEROBA ROSA, FORMADOS EM MEIO FCA.	56
TABELA 14: CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA DE COLÔNIAS DE <i>Phomopsis</i> spp. ASSOCIADOS AS SEMENTES DE PEROBA ROSA, EM MEIO BDA, A 24 °C, COM FOTOFASE DE 12 HORAS, POR 21 DIAS.....	61
TABELA 15: SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE <i>Fusarium</i> spp. DE PEROBA ROSA, MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DAS REGIÕES ITS1-5.8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL E FATOR DE ELONGAÇÃO 1-ALPHA (EF-1α).....	64
TABELA 16: SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE <i>Phomopsis</i> sp. DE PEROBA ROSA, MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DAS REGIÕES ITS1-5.8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL E FATOR DE ELONGAÇÃO 1-ALPHA (EF-1α).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
BDA	Meio batata dextrose ágar
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
DET	Fungos isolados no teste de epifíticos
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifosfato
EF-1 α	Fator de elongação α
END	Fungos isolados no teste de endofíticos
FCA	Meio folha-de-cravo-ágar
H ₂ O	Água
ITS	Região interespaçadora
ITS1	Região interespaçadora (18S-5.8S)
ITS2	Região interespaçadora (5.8S-28S)
IVG	Índice de velocidade de germinação
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
MSF	Meio seletivo de <i>Fusarium</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PN	Plântula normal
PS	Plântula sintomática
pH	Potencial hidrogeniônico
rDNA	Ácido desoxiribonucleico ribossomal
SNG	Sementes não germinadas
TR	Fungos isolados no teste de transmissão

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO GERAL.....	20
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Peroba rosa.....	21
3.2 Sanidade de sementes.....	23
3.3 Fungos endofíticos	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE SEMENTES	27
4.2 QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES.....	28
4.2.1 Teste de Germinação e Vigor.....	28
4.3 QUALIDADE SANITÁRIA DAS SEMENTES	29
4.3.1 Detecção e isolamento de fungos endofíticos em batata-dextrose-água (BDA) e meio seletivo de <i>Fusarium</i> (MSF)	29
4.3.2 Detecção e isolamento de fungos epifíticos em meio seletivo de <i>Fusarium</i> (MSF)	30
4.3.3 Teste de transmissão de fungos das sementes para plântulas de peroba rosa	31
4.3.4 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de peroba rosa	31
4.3.5 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Phomopsis</i> spp. em mudas de peroba rosa	32
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	33
4.4.1 Identificação de <i>Fusarium</i>	34
4.4.2 Caracterização de <i>Phomopsis</i> spp.	35
4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR de <i>Fusarium</i> spp. E <i>Phomopsis</i> spp.	35

4.5.1 Extração de DNA.....	35
4.5.2 Amplificação da Região ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA fúngico.....	35
4.5.3 Amplificação da Região EF-1 α	36
4.5.4 Reação de sequenciamento.....	36
4.5.5 Edição e Análise das Sequências	37
4.6 Análise Estatística	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES.....	38
5.1.1 Teste de Germinação e Vigor.....	38
5.2 QUALIDADE SANITÁRIA DAS SEMENTES	39
5.2.1 Detecção e isolamento de fungos endofíticos em batata-dextrose-água (BDA) e meio seletivo de <i>Fusarium</i> (MSF)	39
5.2.2 Detecção e isolamento de fungos epifíticos em meio seletivo de <i>Fusarium</i> (MSF)	41
5.2.3 Teste de transmissão de fungos das sementes para plântulas de peroba rosa	43
5.2.4 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de peroba rosa	45
5.2.5 Teste de patogenicidade de <i>Fusarium</i> spp. e <i>Phomopsis</i> spp. em mudas de peroba rosa.	48
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS.....	52
5.3.1 Identificação de <i>Fusarium</i>	52
5.3.2 Caracterização de <i>Phomopsis</i> spp.....	60
5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR de <i>Fusarium</i> spp. E <i>Phomopsis</i> spp.	63
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

A peroba rosa (*Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg.), família Apocynaceae, é uma espécie florestal encontrada na Floresta Estacional Semidecidual, na formação montana e submontana (VELOSO *et al.*, 1991; CARVALHO, 2004). Possui distribuição natural do extremo nordeste da Argentina, ao norte da Colômbia, ao norte e leste do Paraguai, Peru, norte e noroeste da Venezuela e Brasil. No Brasil ocorre do extremo sul da Bahia e norte do Espírito Santo, onde são muito raras, no sul de Goiás, centro de Minas Gerais, sul do Mato grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo e norte e noroeste do Paraná (RIZZINI, 1990; CARVALHO, 2004).

A peroba rosa apresenta madeira de excelente qualidade, amplamente usada na construção civil, naval, carpintaria, indústria de móveis e reflorestamentos. Em função da exploração madeireira intensa, fragmentação e destruição dos ecossistemas naturais de origem, a área de ocorrência de peroba rosa no Brasil encontra-se drasticamente reduzida, sendo dificilmente encontrada em alguns Estados, como Rio de Janeiro e Minas Gerais (IPEF/EMBRAPA, 1981; RIZZINI, 1990). Devido ao alto valor comercial, a peroba rosa corre perigo de extinção pela intensa exploração.

De acordo com Carvalho (2004) é necessário implantar um programa de conservação genética para peroba rosa. A estratégia conservacionista deve priorizar a conservação *in situ*, uma vez que a espécie não se desenvolve nos estágios iniciais a pleno sol, dependendo da estrutura e fisionomia da floresta para que seja possível a manutenção e perpetuação de suas populações naturais. A estratégia de conservação *in situ*, pode ser complementada pela conservação *ex situ*, por meio do fomento ao plantio de essências florestais nativas, em sistemas consorciados ou agroflorestais (CARVALHO, 2004). No entanto, há falta de informações sobre esta espécie, especialmente sobre a qualidade de suas sementes.

Poucos estudos têm sido realizados no setor de sementes florestais brasileiro, para determinar a qualidade sanitária de espécies florestais nativas (LAZAROTTO *et al.*, 2012). Os trabalhos publicados concentram-se em detectar os microrganismos associados às sementes, sem relacioná-los com fatores importantes, como efeito na

germinação e na produção de mudas em viveiros e ao aumento dos custos dos reflorestamentos (SALES, 1992; NETTO e FAIAD, 1995; VECHIATO e PARISI, 2013). Na literatura são escassas as informações sobre a sanidade das sementes de peroba rosa (SANTOS *et al.*, 2011).

A contaminação das sementes e frutos de essências florestais geralmente no solo onde são colonizados por diversos fungos, incluindo saprófitas e parasitas facultativos, tais como: *Alternaria* sp., *Cylindrocladium* sp., *Fusarium* sp., *Phoma* sp., *Phomopsis* sp., *Pythium* sp., *Rhizoctonia* sp. e *Trichoderma* sp. Com o transporte das sementes e frutos para o beneficiamento ou armazenamento, os fungos acabam sendo disseminados para as sementes sadias (FERREIRA, 1989).

A associação de fungos patogênicos com sementes pode resultar em diversos danos às plântulas, podendo causar morte em pré e pós-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, manchas necróticas em folhas e caules, deformações como hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos e infecções latentes (NEERGAARD, 1979).

Doenças como tombamento de mudas e podridão de raízes estão entre as mais comuns associadas à transmissão de fungos às sementes (CARNEIRO, 1987). Os sintomas podem ser observados na germinação, antes da emergência da plântula, ou logo após a plântula emergir para a superfície do solo. Caracterizam-se por lesões na região do colo, que inicialmente possuem aspecto de mancha encharcada e logo aumentam de tamanho e escurecem, provocando a destruição dos tecidos. O caule enfraquecido leva ao tombamento da plântula (AMORIM, KIMATI e BERGAMIN FILHO, 2011). Os principais agentes causais do tombamento pertencem aos gêneros *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora*.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de dez lotes de sementes de peroba rosa, identificando e avaliando fungos que são transmitidos pelas sementes e que possam causar danos à germinação e desenvolvimento das plantas.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de 10 lotes de sementes de peroba rosa, oriundas de quatro regiões do estado do Paraná e identificar fungos potencialmente patogênicos que são transmitidos pelas sementes causando danos a germinação e desenvolvimento das plantas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a qualidade fisiológica das sementes de peroba rosa.
- Detectar, isolar e identificar fungos endofíticos e epifíticos nas sementes de peroba rosa.
- Avaliar a transmissão e a patogenicidade dos fungos potencialmente fitopatogênicos encontrados nas sementes de peroba rosa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Peroba rosa

O gênero *Aspidosperma* é composto de 43 espécies, com distribuição em diferentes tipos de vegetação, desde o México até a Argentina, encontrando-se a maioria no Brasil (MARCONDES-FERREIRA NETO, 1988). São conhecidas popularmente como pereiro, peroba, guatambu, perobinha entre outros e destacam-se por suas madeiras amarelas, amareladas ou amarelo-rosadas (RIZZINI, 1990).

A espécie *Aspidosperma polyneuron* (peroba rosa) pertence à família Apocynaceae, sendo característica da Floresta Estacional Semidecidual, na formação montana e submontana (VELOSO *et al.*, 1991; CARVALHO, 2004). Apresenta madeira de excelente qualidade, amplamente usada na construção civil, naval, carpintaria, indústria de móveis e reflorestamentos.

A peroba rosa possui distribuição natural do extremo nordeste da Argentina, ao norte da Colômbia, ao norte e leste do Paraguai, Peru, norte e noroeste da Venezuela e Brasil. No Brasil ocorre do extremo sul da Bahia e norte do Espírito Santo, onde são muito raras, no sul de Goiás, centro de Minas Gerais, sul do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo e norte e noroeste do Paraná (RIZZINI, 1990; CARVALHO, 2004).

Segundo Carvalho (2004), peroba rosa é uma espécie clímax ou secundária de sucessão tardia, ou seja, não precisam de clareira para germinar e podem desenvolver-se até o estágio adulto sem a presença da mesma, porém, não se reproduzem à sombra (MALTEZ, 1997). É uma espécie capaz de regenerar-se naturalmente em vários estratos florestais, podendo formar perobais de até 400 m³ por alqueire, além de ser uma árvore longeva, que pode ultrapassar os 1.200 anos de idade. (CARVALHO, 2004).

No Paraná a floração de peroba rosa ocorre entre novembro e dezembro enquanto a frutificação ocorre de julho a outubro. A polinização é realizada por mariposas, atraídas pelas flores de tamanho pequeno, com coloração esbranquiçada e cheiro atrativo (CARVALHO, 2004). No entanto, a espécie

apresenta frutificação irregular, com produção de grandes quantidades de sementes a cada dois ou quatro anos e início da idade reprodutiva com entre 20 e 30 anos. A coleta de sementes é dificultada pelo grande porte da árvore. A dispersão das sementes é anemocórica e 1 kg pode conter de 3.600 a 14.000 sementes (CARVALHO, 2004).

As sementes apresentam forma elíptica, com 2 a 4 cm de comprimento por 8 a 10 mm de largura, providas de núcleo seminífero basal, do qual parte sua asa membranácea parda. As sementes são albuminosas e apresentam alta taxa de poliembrionia (SOUZA e MOSCHETA, 1987). Não apresentam dormência e perdem a viabilidade em aproximadamente seis meses. A germinação é irregular, com variação de 35 a 70% e inicia entre 14 e 60 dias (CARVALHO, 2004).

Em função da exploração madeireira intensa, fragmentação e destruição dos ecossistemas naturais de origem, a área de ocorrência de peroba rosa no Brasil encontra-se drasticamente reduzida, sendo dificilmente encontrada em alguns Estados, como Rio de Janeiro e Minas Gerais (IPEF/EMBRAPA, 1981; RIZZINI, 1990).

Na região de florestas em solos oriundos do Arenito Caiuá, do oeste e noroeste do Paraná ao sudoeste do Mato Grosso do Sul, a cobertura do estrato emergente era composto de 30 a 60% por peroba rosa (LEITE *et al.*, 1986). Em florestas com solos de terra roxa no norte do Paraná, a peroba rosa dominava a cobertura do estrato emergente, constituindo de 60 a 80% de forma evidente (KLEIN, 1985). A espécie encontra-se na lista para conservação *ex situ* e *in situ* no Brasil e Venezuela. Também foi enquadrada como espécie rara na Floresta Estacional Semidecidual na lista de plantas ameaçadas de extinção no estado do Paraná (HATSCHBAC e ZILLER, 1995; CARVALHO, 2004).

Conforme Carvalho (2004) é necessário implantar um programa de conservação genética para peroba rosa com urgência. A estratégia conservacionista deve priorizar a conservação *in situ*, uma vez que a espécie não se desenvolve a pleno sol nos estágios iniciais, dependendo da estrutura e fisionomia da floresta para que seja possível a manutenção e perpetuação de suas populações naturais. A estratégia de conservação *in situ*, pode ser complementada pela conservação *ex situ*, por meio do fomento ao plantio de essências florestais nativas, em sistemas consorciados ou agroflorestais (CARVALHO, 2004).

3.2 Sanidade de sementes

A necessidade de sementes de espécies florestais nativas para restauração de florestas, recuperação de áreas degradadas e instalação de áreas comerciais, gerou um aumento na demanda, exigindo uma maior oferta de sementes (SANTOS *et al.*, 2011). Com a intensificação da procura de sementes florestais para reflorestamentos, seja este com fins preservacionistas ou lucrativos, ampliou o intercâmbio de sementes entre regiões nos últimos anos, o que constitui um meio inevitável de dispersão de patógenos. Haja visto que as sementes podem carregar em sua superfície ou internamente, fungos e outros microrganismos (RAHALKAR e NEERGAARD, 1969), constituindo-se como via principal de disseminação e acesso de patógenos de plantas.

Poucos estudos têm sido realizados no setor de sementes florestais brasileiro para determinar a qualidade sanitária e a patologia de sementes de espécies florestais (LAZAROTTO *et al.*, 2012). Os trabalhos publicados concentram-se em detectar os microrganismos associados às sementes, sem relacioná-los com fatores importantes, como efeito na germinação devido a perdas por meio da deterioração, anormalidades, lesões em plântulas, bem como a redução drástica da produção de mudas em viveiros e ao aumento dos custos de reflorestamentos (SALES, 1992; NETTO e FAIAD, 1995; VECHIATO e PARISI, 2013).

No período de coleta de sementes florestais, muitos frutos encontram-se abertos e recebem contaminações pela ação do vento, chuva e insetos. Devido à dificuldade de se coletar em árvores de grande porte, a coleta de sementes ocasionalmente é feita de frutos ou sementes caídas no chão. As sementes são colonizadas por patógenos de vida saprofítica no solo, onde os fungos são os agentes causais mais importantes vinculados às sementes, dentre os gêneros *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Phoma*, *Phomopsis* e *Periconia*, entre outros (CARNEIRO, 1986; SANTOS *et al.*, 2011).

Os patógenos podem contaminar as sementes tanto superficialmente, quanto colonizando os tecidos internos. Se os patógenos estiverem associados internamente, a chance de transmissão às plântulas é mais efetiva, porém, se a

contaminação for externa, os danos serão nas fases iniciais do processo de germinação (NEERGAARD, 1979).

A associação de fungos patogênicos com sementes pode resultar em diversos danos prejudiciais à plântula. Dentre os quais, morte em pré e pós-emergência, podridão radicular, tombamento de mudas, manchas necróticas em folhas e caules, deformações como hipertrofias e subdesenvolvimento, descoloração de tecidos e infecções latentes (NEERGAARD, 1979).

Em geral os fungos fitopatogênicos podem ser transportados pelas sementes, porém, a transmissão de inúmeros deles, por esse meio, não é totalmente conhecida (ARAÚJO, 2008).

Doenças como tombamento de mudas e podridão de raízes estão entre as mais comuns associadas a transmissão de fungos as sementes (CARNEIRO, 1987). Os principais agentes causais do tombamento são *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora*. Os sintomas podem ser observados na germinação, antes da emergência da plântula, ou logo após a plântula emergir para a superfície do solo. Caracteriza-se por lesões na região do colo, que inicialmente possui aspecto de mancha encharcada e logo aumenta de tamanho e escurece, provocando a destruição dos tecidos. O caule enfraquecido leva ao tombamento da plântula (AMORIM, KIMATI e BERGAMIN FILHO, 2011).

A podridão de raízes é causada pelos mesmos agentes típicos do tombamento, *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora*, porém, esta doença caracteriza-se pelo declínio geral da muda. A doença afeta o sistema radicular da planta, comprometendo a absorção de água e nutrientes e interferindo em seu desenvolvimento. Os sintomas se iniciam com o escurecimento de raízes jovens e posteriormente sua decomposição, levando a plântula a secar e morrer (AMORIM, KIMATI e BERGAMIN FILHO, 2011).

3.3 Fungos endofíticos

Os microrganismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, sendo Bary em 1866, quem delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas. No final da década de 70, os microrganismos endofíticos

passaram a adquirir importância científica, pois descobriu-se que realizavam interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo as plantas do ataque de insetos, de doenças e de herbívoros (AZEVEDO *et al.*, 2002).

Acredita-se que os microrganismos endofíticos provavelmente se estabeleceram pela co-evolução com as plantas há milhares de anos, havendo evidências dessa interação pela detecção de microrganismos em folhas e ramos fossilizados (TAYLOR e TAYLOR, 2000; SILVA e BETTIOL, 2009).

Considerando esta íntima associação, geralmente mutualística, surgiu a hipótese de que os endófitos podem exercer efeitos benéficos nos seus hospedeiros, como promoção de crescimento e controle de fitopatógenos (SILVA e BETTIOL, 2009).

Caracterizam-se como fungos endofíticos, aqueles que pelo menos durante uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior dos tecidos de seus hospedeiros, sem demonstrar quaisquer sintomas visíveis e desempenham relações ecológicas variadas e estreitas (ARAÚJO *et al.*, 2002). Azevedo e Araújo (2007) definem como microrganismos endofíticos, todos aqueles cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar prejuízo ao hospedeiro, e que não desenvolvem estruturas externas visíveis.

O nicho ocupado pelos microrganismos e sua interação com o hospedeiro é o que os diferencia entre endofítico, epifítico e fitopatógeno, não existindo um limite claro que separe estes grupos, mas sim, um gradiente entre eles (STROBEL *et al.*, 2004).

Os endófitos podem penetrar nos tecidos da espécie vegetal hospedeira por meio de aberturas e lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas (transmissão horizontal). Pode ocorrer o estabelecimento desses fungos pelas sementes do hospedeiro, onde o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida (transmissão vertical). A interação gerada pela transmissão vertical é predominantemente mutualística, enquanto a interação causada pela transmissão horizontal tende a ser antagonista (MELO, 1998; ALY *et al.*, 2011).

A forma com que o fungo coloniza uma espécie vegetal pode alterar o tipo de interação endófito-hospedeiro. O endófito tende a permanecer em um estado latente

por toda sua vida ou por um período prolongado, enquanto as condições ambientais lhe forem favoráveis. Caso contrário, o endófito pode assumir uma função patogênica (ALY *et al.*, 2010). A composição de uma comunidade de endófitos e a frequência de infecção pode variar de acordo com a espécie hospedeira, idade do vegetal, características ambientais e vegetação associada (STONE, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS DE SEMENTES

Os lotes de sementes de peroba rosa são provenientes de quatro regiões do estado Paraná, envolvendo 10 municípios (TABELA 1). As sementes foram fornecidas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR - Campus Dois Vizinhos). Os testes de qualidade fisiológica (germinação e vigor) e sanidade (detecção, transmissão, patogenicidade e identificação morfológica dos fungos) foram desenvolvidos no Laboratório de Sementes Florestais, Laboratório de Patologia Florestal e em casa de vegetação, da Embrapa Florestas, Colombo, PR. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro) da Universidade Federal do Paraná.

TABELA 1: PROCEDÊNCIA DOS LOTES DE SEMENTES DE PEROBA ROSA COLETADAS, NAS REGIÕES E MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARANÁ

LOTES ¹	REGIÃO	MUNICÍPIO	PESO DE MIL SEMENTES (g)
1	Oeste	Capitão Leonidas Marques	70,3
11		Boa Vista da Aparecida	105,3
22		Corbélia	108,6
3	Sudoeste	Cruzeiro do Iguaçu	97,3
10		São Jorge do Oeste	89,5
7		Realeza	97,0
13		Nova Prata do Iguaçu	103,5
1M	Centro-Sul	Telêmaco Borba	79,7
8CM	Noroeste	Terra Boa	81,3
9CM		Cianorte	83,5

FONTE: O autor (2016).

NOTA: ¹ - O número do lote refere-se à identificação das árvores em que foram coletadas as sementes.

4.2 QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES

4.2.1 Teste de Germinação e Vigor

Para o teste de germinação em rolo de papel, foram utilizadas 150 sementes de cada procedência, divididas em seis repetições de 25 sementes cada. A assepsia das sementes foi realizada com a imersão destas em solução de detergente (cinco gotas de detergente neutro/100 mL de água) por cinco minutos e, em seguida, lavadas em água destilada esterilizada. O substrato consistiu de três folhas de papel “germitest”, sendo duas na base e outra cobrindo as sementes. As folhas foram umedecidas com água destilada esterilizada em 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos foram identificados e acondicionados em saco plástico. Posteriormente, o material foi colocado verticalmente no germinador com temperatura de 25 °C e luz contínua por 24 horas (BRASIL, 2013).

Foram realizadas duas avaliações para germinação, a primeira contagem de germinação (plântulas normais) realizada 12 dias após a instalação do teste e a última aos 26 dias. O índice de velocidade de germinação (IVG) foi determinado com avaliações diárias a partir do primeiro dia de instalação do teste e posteriormente os resultados foram aplicados à fórmula: $IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + \dots + (G_n/N_n)$, onde G – corresponde ao número de sementes germinadas e N – o número de dias avaliados até estabilizar a germinação, verificando-se a emissão da radícula nas sementes. Na última avaliação, aos 26 dias, foi medido o comprimento de parte aérea e radícula, para complementar os parâmetros de vigor das plântulas (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

4.3 QUALIDADE SANITÁRIA DAS SEMENTES

4.3.1 Detecção e isolamento de fungos endofíticos em batata-dextrose-água (BDA) e meio seletivo de *Fusarium* (MSF)

A assepsia das sementes foi realizada conforme protocolo descrito por Araújo *et al.* (2002):

a) lavagem das sementes em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo; b) imersão em solução de álcool 70% por 1 minuto; c) imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 4 minutos; d) imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos; e) enxágue por duas vezes em água ultrapurificada esterilizada.

Para o teste de detecção dos fungos em meio BDA foram utilizadas 100 sementes de cada lote, divididas em vinte repetições de cinco sementes. As sementes desinfestadas foram colocadas sobre papel filtro para secagem e, então, plaqueadas em placas de Petri com meio BDA (39 g de extrato comercial de batata-dextrose-água (HIMEDIA), 1000 mL de água ultrapurificada).

Na detecção dos fungos em meio MSF (15 g de peptona, 5 g de sulfato de magnésio - $MgSO_4$, 1 g de fosfato de potássio - KH_2PO_4 , 1 g de pentacloronitrobenzeno - PCNB, 20 g de ágar, 1000 mL de água ultrapurificada, 40 ppm de cloranfenicol e 80 ppm de ampicilina) (ANDERSON, 1986), foram utilizadas 100 sementes de cada lote, divididas em vinte repetições de cinco sementes. A assepsia e secagem das sementes foi realizada conforme descrito anteriormente. Então, as sementes foram plaqueadas em MSF.

A incubação dos testes BDA e MSF foi realizada em uma temperatura de 20°C, com fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro, por sete dias.

A avaliação consistiu em observar as estruturas fúngicas formadas nas sementes com auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss – Discovery. V20) e, em seguida, foram preparadas lâminas com lactoglicerol azul de metileno para observação em microscópio óptico (Carl Zeiss – AxioLab. A1). A identificação dos fungos em nível de gênero foi realizada conforme descrição de Barnett e Hunter (1972). Os dados de incidência foram expressos em percentagem.

Os fungos isolados foram preservados em triplicatas em tubo inclinado contendo meio BDA e frascos de vidro com água esterilizada (CASTELLANI, 1967), e estocados na micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

4.3.2 Detecção e isolamento de fungos epifíticos em meio seletivo de *Fusarium* (MSF)

A assepsia das sementes foi realizada, conforme o seguinte protocolo (LAZAROTTO *et al.*, 2012): a) lavagem das sementes em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo; b) imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos; c) imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto; d) enxágue por duas vezes em água ultrapurificada e esterilizada.

As sementes foram plaqueadas em meio MSF (ANDERSON, 1986). A incubação foi realizada a uma temperatura de 20 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz/ 12 horas de escuro por sete dias.

A avaliação consistiu em observar as estruturas fúngicas formadas nas sementes com auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss – Discovery. V20) e, em seguida, foram preparadas lâminas com lactoglicerol azul de metileno para observação em microscópio óptico (Carl Zeiss – AxioLab. A1). A identificação dos fungos em nível de gênero foi realizada conforme descrição de Barnett e Hunter (1972). Os dados de incidência foram expressos em percentagem.

Os fungos isolados foram preservados em triplicatas em tubo inclinado contendo meio BDA e frascos de vidro com água esterilizada (CASTELLANI, 1967), e estocados na micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

4.3.3 Teste de transmissão de fungos das sementes para plântulas de peroba rosa

Para o teste de transmissão foram utilizadas 100 sementes sem desinfestação de cada lote. As sementes foram semeadas em tubetes de plástico com vermiculita (uma semente por tubete). O material foi mantido em casa de vegetação com irrigação diária (ROMEIRO *et al.*, 1993).

As avaliações foram realizadas semanalmente iniciando aos 21 dias após a instalação do teste e se estenderam até a 10ª semana. Foi determinado o número de plântulas emergidas sem sintomas e com sintomas. Aos 70 dias, as sementes que não germinaram foram coletadas e colocadas em câmara úmida (caixa tipo 'gerbox' contendo papel 'mata borrão' umedecido em água ultrapurificada e esterilizado) em ambiente de laboratório por 7 dias, para a observação da presença de fungos. Os fungos considerados potencialmente fitopatogênicos foram isolados pelo método direto em placas de Petri com meio BDA, para posterior verificação da sua patogenicidade.

Os fungos isolados foram preservados em triplicatas em tubo inclinado contendo meio BDA e frascos de vidro com água esterilizada (CASTELLANI, 1967), e estocados na micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas.

4.3.4 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. em sementes de peroba rosa

Os isolados de *Fusarium* spp. (TR1, TR2, TR3, TR6, TR8, TR9, TR10, TR11, TR12 e TR13), oriundos do teste de transmissão foram cultivados em meio BDA, a 24 °C, por sete dias, para produção de inóculo. Utilizou-se as sementes do lote 1M, devido à baixa incidência de fungos nos testes iniciais e por apresentar boa germinação.

Para condução do teste, utilizaram-se 50 sementes divididas em cinco repetições de 10, para cada fungo inoculado. As sementes foram desinfestadas em álcool 70% (30 segundos) e hipoclorito de sódio 1% (2 minutos), lavadas em água

ultrapurificada e esterilizada e deixadas para secar sobre papel filtro esterilizado. Em seguida, as sementes foram colocadas em contato com a cultura fúngica em meio BDA por 48 horas. A testemunha consistiu em deixar as sementes em contato com meio BDA sem o fungo (REGO, 2008).

A semeadura foi realizada em bandejas de isopor (uma semente por célula) em substrato de vermiculita. O material foi mantido em casa de vegetação e irrigação diária. As avaliações foram realizadas semanalmente após o 14º dia da instalação do teste e se prolongaram por até 60 dias, contando-se, semanalmente, o número de plântulas emergidas sem sintomas e com sintomas.

Aos 60 dias após a instalação do experimento, foi realizada a recuperação dos fungos para fechamento do postulado de Koch. As sementes que não germinaram foram coletadas e colocadas em câmara úmida (caixa tipo 'gerbox' contendo papel 'mata borrão' umedecido em água ultrapurificada e esterilizado) em ambiente de laboratório por 7 dias, para a observação da presença de fungos e isolamento direto. As plântulas com sintomas foram desinfestadas com imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e enxágue em água ultrapurificada e esterilizada, posteriormente foram colocadas em placas de Petri com meio BDA para isolamento indireto dos fungos.

4.3.5 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. em mudas de peroba rosa

Foram selecionados 60 isolados de fungos considerados potencialmente fitopatogênicos, provenientes dos testes de detecção e transmissão, sendo 32 isolados de *Phomopsis* spp. e 28 isolados de *Fusarium* spp. para serem utilizados neste teste.

Foram utilizadas mudas com um ano de idade cultivadas a partir de sementes do lote 1M, em tubetes plástico com vermiculita por 60 dias e depois repicadas para tubetes com substrato por 10 meses e fertilização mensal com NPK. As mudas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação diária.

Para produção de inóculo, os fungos foram cultivados em meio BDA, a 24 °C, por sete dias. Foram retirados 10 discos (5 mm de diâmetro) de meio de cultura contendo micélio em crescimento ativo de cada isolado para inoculação nas folhas das mudas de peroba rosa. Os discos foram depositados na face adaxial de folhas, com 10 ferimentos prévios feitos por agulha, atingindo uma área de 4 mm². Para cada isolado, foram inoculadas três mudas, selecionando dez folhas jovens e depositando 1 disco por folha. A testemunha recebeu apenas disco de BDA sem micélio. Em seguida, as mudas foram mantidas em câmara úmida, preparada em caixas de plástico transparente tipo organizadora de 50 L com tampa e uma lâmina de água, por 72 horas em casa de vegetação sem controle de temperatura. Após esse período as mudas foram retiradas da câmara úmida e mantidas em casa de vegetação por 30 dias (ANJOS *et al.*, 2009).

As avaliações foram realizadas semanalmente, observando-se a presença ou não de sintomas. A recuperação dos fungos inoculados foi realizada por isolamento indireto. Um fragmento das folhas com lesão foi cortado desinfestado com imersão em solução de álcool 70% por 30 segundos, imersão em solução de hipoclorito de sódio 1% por 1 minuto e enxágue em água ultrapurificada e esterilizada, posteriormente foram colocados em placas de Petri com meio BDA para confirmação do gênero.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

Para realizar a identificação dos fungos em nível de gênero, utilizou-se a técnica de microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999). Para isso, foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Dois cubos de aproximadamente 1 cm² de BDA foram cortados e colocados nas extremidades da lâmina contida no interior da placa. O fungo foi inoculado nas laterais do cubo, o qual foi coberto por uma lamínula esterilizada. O algodão no interior foi umedecido com água destilada e esterilizada e a placa mantida em BOD por 7 - 14 dias, a 24 °C.

Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas e colocadas sobre uma lâmina contendo uma gota de lactoglicerol azul de metileno e, em seguida,

observada em microscópio óptico (Carl Zeiss – AxioLab. A1). A identificação dos gêneros de fungos foi baseada em Barnett e Hunter (1972).

4.4.1 Identificação de *Fusarium*

Para identificação de *Fusarium*, em nível de espécie, foi utilizada a metodologia proposta por Ventura (1999). Para isso, folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) foram coletadas da planta e lavadas com água e sabão para remoção de poeira e resíduos. As folhas foram cortadas em fragmentos de 1 cm e, então, autoclavadas. Posteriormente, o fungo foi inoculado no centro de placas de Petri contendo meio ágar-água 2% (20 g de ágar, 1000 mL de água ultrapurificada) e cinco fragmentos de folhas foram dispostos ao redor do inóculo. As placas foram mantidas em BOD a 24 °C, por 14 dias.

Após o período de incubação, as lâminas foram preparadas com lactofenol azul de algodão, com o micélio que cresceu sobre os fragmentos de folhas de cravo e raspando o micélio sobre o meio de cultura. Foram avaliadas as seguintes características morfológicas: Esporodóquio - formação e cor; Macroconídios - presença, forma, quantidade de septos, formato da célula basal e apical; Microconídios - presença, forma, quantidade de septos, conidiogênese e arranjo; Clamidósporo - presença, localização e arranjo. Foram medidas 50 estruturas de cada isolado de *Fusarium* com auxílio do microscópio óptico trinocular Carl Zeiss – AxioLab. A1.

Para avaliar as características da colônia - velocidade de crescimento, tipo de micélio aéreo e cor, os isolados foram crescidos em meio BDA a 24 °C, por 72 horas.

As características observadas foram comparadas com chave taxonômica do gênero (VENTURA, 1999) e com literatura especializada (LESLIE e SUMMERELL, 2006).

4.4.2 Caracterização de *Phomopsis* spp.

A caracterização dos isolados de *Phomopsis* spp. foi realizada com base na forma dos bordos da colônia, crescimento micelial, aspecto da colônia, coloração e formação de picnídios. Os fungos foram incubados durante 14 dias, a 24 °C, sob luz contínua. O diâmetro das colônias foi medido ao quinto dia de crescimento. Para análise da micromorfologia, os picnídios foram comprimidos entre a lâmina e a lamínula com uma gota de lactofenol azul de algodão após 21 dias, para observação dos conídios.

4.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium* spp. E *Phomopsis* spp.

Os isolados de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. foram identificados a partir do sequenciamento da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal e fator de alongação - 1 α (EF-1 α) (WHITE *et al.* 1990; CARBONE e KOHN, 1999).

4.5.1 Extração de DNA

Para a extração de DNA, os isolados de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. foram cultivados em meio BDA, a 24 °C, por 96 horas. Em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL com sílica e celite (2:1) foi colocado cerca de 1 cm² de massa micelial das culturas. O pellet foi ressuspenso em 100 μ L de água miliQ e deixado por cerca de duas horas (ou *overnight*) em temperatura ambiente. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Launches New NanoDrop 2000) e posteriormente preservado em freezer -20 °C (VICENTE, 2000).

4.5.2 Amplificação da Região ITS1 - 5.8S - ITS2 do rDNA fúngico

A PCR foi realizada com os primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), que amplificam a região ITS1, 5,8S e ITS2 do rDNA (WHITE *et al.* 1990). As condições da reação foram realizadas,

conforme segue: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,5 U de Taq polimerase, 0,14 μ M de primers (3,5 pmoles), 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$, e volume final de 25 μ L.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*[®] modelo *Mastercycler Gradient*, com desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C; seguida de extensão final de 3 minutos a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (1 kb *Ludwig Biotec*).

4.5.3 Amplificação da Região EF-1 α

A PCR foi realizada com os primers EF1-728F (5' CATCGAGAAGTTCGAGAAGG3') e EF1-986R (5' TACTTGAAGGAACCCTTACC 3'), que amplificam a região parcial do fator de elongação 1-alpha (CARBONE e KOHN, 1999). As condições da reação utilizadas estão de acordo com a descrição a seguir: 50 ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,5 U de Taq polimerase, 0,1 μ M de primers, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 mM de $MgCl_2$, e volume final de 25 μ L.

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*[®] modelo *Mastercycler Gradient*, com desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 90 segundos a 72 °C; seguida de extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% utilizando o marcador de massa *Low DNA Mass Ladder* (1 kb *Ludwig Biotec*).

4.5.4 Reação de sequenciamento

O sequenciamento das regiões ITS1-5,8S-ITS2 do DNA ribossomal fúngico e EF-1 α foi realizado pelo método de terminação de cadeia (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977), utilizando a incorporação de dideoxinucleotídeos fluorescentes, em Sequenciador Automático de DNA.

As reações de sequenciamento consistiram de 1 a 3 µL do produto de PCR purificado, 0,5 µL de Buffer; 0,5 µL de cada iniciador (primer); 0,5 µL do Big-Dye, completando-se para um volume final de 10 µL com água ultra pura. As condições de amplificação utilizadas foram: 96 °C por 1 minuto, e por 35 ciclos a 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. As amostras foram sequenciadas em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

4.5.5 Edição e Análise das Sequências

As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6 (BONFIELD *et al.* 2006) e alinhadas pelo programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.* 2006). As sequências foram comparadas com outras sequências existentes no banco de dados NCBI pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1997) permitindo a detecção de similaridade de uma sequência biológica com sequências caracterizadas já existentes. Para a análise das sequências obtidas neste trabalho foi utilizado o programa BLASTn.

4.6 Análise Estatística

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado nos testes. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) a 1% de probabilidade e Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas utilizando o software ASSISTAT 7.7 (SILVA e AZEVEDO, 2009).

5 RESULTADOS

5.1 QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES

5.1.1 Teste de Germinação e Vigor

Os 10 lotes de sementes de peroba rosa foram avaliados quanto ao seu potencial germinativo. A germinação das sementes variou de 9,3 a 60% (TABELA 2).

Os lotes 1M, 3 e 9CM foram os que apresentaram maior porcentagem de germinação com 56,6%, 60% e 58%, respectivamente. No entanto, não diferiram estatisticamente das amostras 8CM e 22. A amostra 1M apresentou maior número de plântulas normais na primeira contagem de germinação (PC), atingindo aos 12 dias uma média de 10,5 plântulas. Com relação ao índice de velocidade de germinação (IVG), as amostras com melhor comportamento foram: 1M, 3, 8CM e 9CM.

A amostra 9CM apresentou o maior comprimento da parte aérea, com 66,8 mm, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,01$) apenas das amostras 7, 10 e 11. Quanto ao comprimento de radícula, a amostra 22 apresentou 120,5 mm, diferindo apenas das amostras 7 e 10.

TABELA 2: GERMINAÇÃO (G), PRIMEIRA CONTAGEM (PC), ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG), COMPRIMENTO DE PARTE AÉREA (CA) E COMPRIMENTO DE RADÍCULA (CR) OBTIDOS NOS TESTES DE GERMINAÇÃO E VIGOR PARA PEROBA ROSA AOS 26 DIAS, A 25 °C.

LOTES	G (%)	PC (12 dias)	IVG (sementes/dia)	CA (mm)	CR (mm)
1	26 cd**	3,3 cd**	5,1 bcd**	62,5 abc**	95,8 ab**
1M	56,6 a	10,5 a	11,6 a	65,7 ab	90,8 ab
3	60 a	6,3 bc	11,8 a	60,6 abc	111,9 ab
7	16,6 cd	1,8 d	3,16 cd	50,8 cd	87,3 b
8CM	50,6 ab	6,5 bc	10,2 a	57,8 abcd	92,9 ab
9CM	58 a	8,6 ab	11,7 a	66,8 a	95,8 ab
10	9,3 d	0,1 d	1,5 d	52,7 bcd	85,3 b
11	18 cd	0,3 d	2,9 cd	46,3 d	101,6 ab
13	34 bc	2,5 d	6,1 bc	58,9 abc	114,9 ab
22	48 ab	1 d	8,4 ab	54,8 abcd	120,5 a

FONTE: O autor (2016).

**Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey, ao nível de significância de 1%.

5.2 QUALIDADE SANITÁRIA DAS SEMENTES

5.2.1 Detecção e isolamento de fungos endofíticos em batata-dextrose-ágar (BDA) e meio seletivo de *Fusarium* (MSF)

Dentre os fungos listados na Tabela 3, pode-se observar uma alta incidência de *Phomopsis* spp. (FIGURA 1C), sendo encontrado em todos os lotes de sementes de peroba rosa, chegando a atingir 65% de incidência no lote 11. Não se verificou diferença estatística entre os lotes 3, 8CM e 10. O gênero *Fusarium* também foi encontrado como endófito (FIGURA 1D), porém, em valores mais baixos nos lotes de sementes, chegando ao máximo de 7% no lote 7 (TABELA 3). Não houve diferença estatística significativa entre os lotes.

Outros fungos encontrados foram: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. e *Mycelia sterilia* (TABELA 3).

TABELA 3: INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS (%) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA DETECTADOS EM MEIO BDA, A 20 °C, 12 HORAS DE FOTOFASE, AOS 7 DIAS.

LOTES	OUTROS FUNGOS ¹	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Trichoderma</i> sp.
1	5 b**	16 a**	2 b**	2 ^{ns}	17 c**	0 ^{ns}
1M	38 a	0 b	1 b	0	23 bc	0
3	15 b	0 b	4 b	6	57 ab	0
7	15 b	0 b	40 a	7	23 bc	0
8CM	9 b	6 b	0 b	6	28 abc	0
9CM	0 b	0 b	0 b	1	18 c	0
10	5 b	3 b	4 b	2	48 abc	10
11	8 b	0 b	2 b	2	65 a	5
13	3 b	0 b	0 b	0	25 bc	0
22	4 b	0 b	2 b	0	12 c	0

FONTE: O autor (2016).

**Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1%; ^{ns}= não significativo; ¹= Outros fungos: *Rhizopus* e micélio estéril.

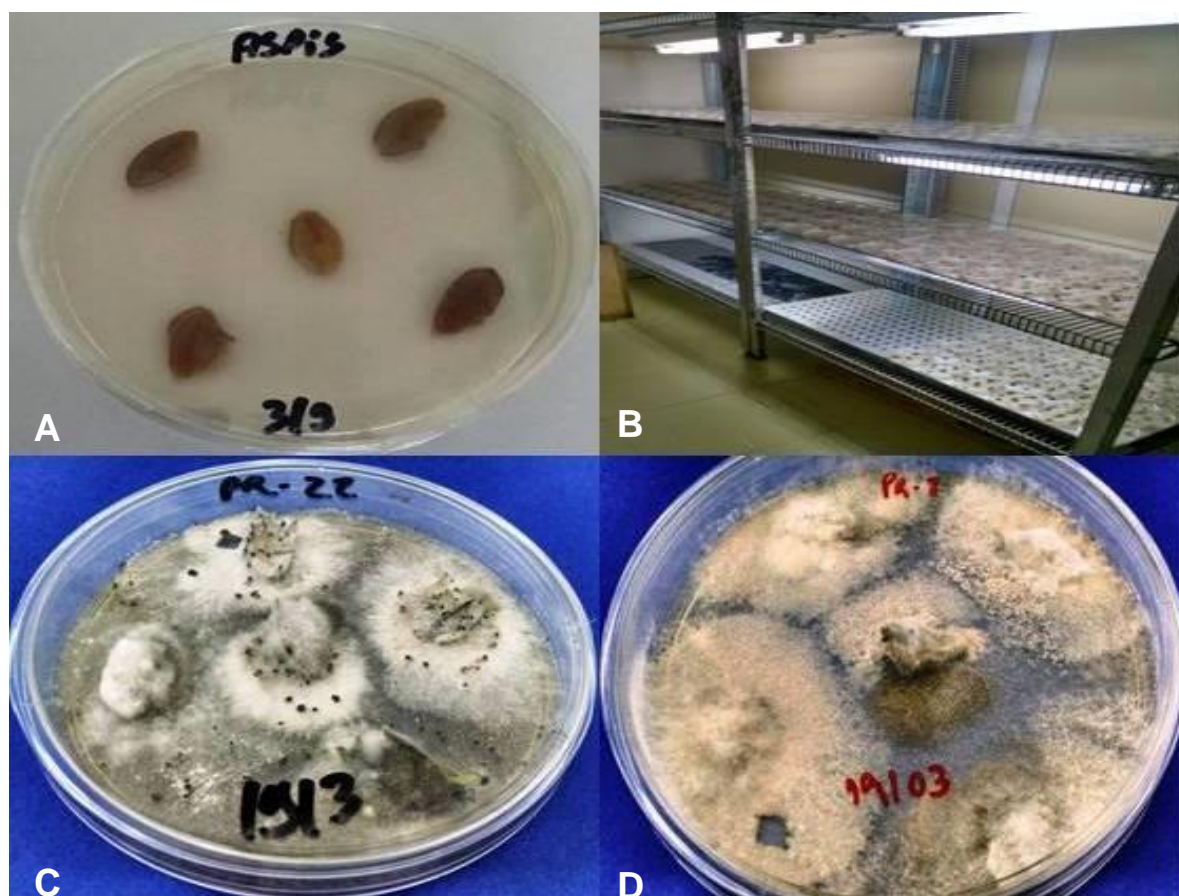


FIGURA 1: TESTE DE DETECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS. A - PLACA COM SEMENTES DESINFESTADAS; B - CÂMARA DE INCUBAÇÃO; C – SEMENTES COLONIZADAS POR *Phomopsis* sp.; D - SEMENTES COLONIZADAS POR *Fusarium* sp.

FONTE: O autor (2016).

No teste para endófitos em MSF, *Fusarium* spp. foi encontrado em dois lotes, 1 e 1M com 1% de incidência (TABELA 4). Enquanto que, *Phomopsis* spp. foi observado em 70% dos lotes, atingindo valores de até 16%.

Outros fungos encontrados foram: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp. e *Mycelia sterilia* (TABELA 4), chegando a 41% no lote 10.

TABELA 4: INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS (%) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA DETECTADOS EM MEIO SELETIVO (MSF), A 20 °C, 12 HORAS DE FOTOFASE, AOS 7 DIAS.

LOTES	OUTROS FUNGOS ¹	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Trichoderma</i> sp.
1	2 b**	0 ^{ns}	3 ^{ns}	1 ^{ns}	0 b**	0 ^{ns}
1M	2 b	0	0	1	0 b	0
3	14 ab	3	3	0	16 a	5
7	37 a	0	1	0	13 ab	0
8CM	22 ab	0	0	0	4 ab	0
9CM	23 ab	1	0	0	2 ab	0
10	41a	0	0	0	6 ab	0
11	12 ab	0	2	0	3 ab	0
13	24 ab	0	0	0	0 b	0
22	14 ab	0	1	0	1 ab	0

FONTE: O autor (2016).

**Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1%; ^{ns} = não significativo; ¹ = Outros fungos: *Rhizopus* e micélio estéril.

5.2.2 Detecção e isolamento de fungos epifíticos em meio seletivo de *Fusarium* (MSF)

O gênero *Fusarium* foi encontrado em todos os lotes de sementes, exceto no lote 10, e atingiu 52% de incidência no lote 8CM, não diferindo estatisticamente do lote 9CM, com 29% (TABELA 5). Enquanto que, o gênero *Phomopsis* foi encontrado em baixos valores em apenas cinco lotes, exceto para o lote 22 onde atingiu 25% (TABELA 5).

Na Tabela 5 é possível verificar uma alta incidência de fungos de hábito saprofítico, como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. O gênero *Penicillium* foi encontrado em porcentagem elevada nos lotes 1, 1M, 3, 7, 13 e 22, chegando a

88% de incidência no lote 1. O gênero *Aspergillus* foi encontrado nos lotes 9CM e 8CM com valores de 48% e 41% respectivamente.

TABELA 5: INCIDÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EPIFÍTICOS (%) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA DETECTADOS EM MEIO SELETIVO (MSF), A 20 °C, 12 HORAS DE FOTOFASE, AOS 7 DIAS.

LOTES	OUTROS FUNGOS ¹	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phomopsis</i> spp.	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichotecium</i> sp.
1	10 c**	0 b**	88 a**	2 c**	0 b**	0 ^{ns}	0 ^{ns}
1M	17 bc	0 b	63 ab	17 bc	3 b	0	0
3	31 bc	0 b	60 ab	7 bc	2 b	0	0
7	50 b	0 b	38 bc	12 bc	0 b	0	0
8CM	0 c	48 a	0 d	52 a	0 b	0	0
9CM	19 bc	41 a	3 d	29 ab	8 b	0	0
10	99 a	1 b	0 d	0 c	0 b	0	0
11	85 a	0 b	0 d	13 bc	0 b	0	0
13	21 bc	0 b	54 bc	11 bc	4 b	5	5
22	49 b	0 b	24 cd	2 c	25 a	0	0

FONTE: O autor (2016).

**Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1%; ^{ns}= não significativo; ¹= Outros fungos: *Rhizopus* e micélio estéril.

Para os fungos endofíticos, em meio BDA, *Phomopsis* spp. apresentou 31,6% de incidência e *Fusarium* 2,6%. Para ambos, o meio BDA apresentou maiores valores de incidência do que o MSF.

Quanto à avaliação de fungos epifíticos em meio MSF, *Fusarium* spp. atingiu 14,5% e *Phomopsis* spp. 4,2% (TABELA 6).

TABELA 6: INCIDÊNCIA MÉDIA (%) DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS - *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. - NOS TESTES DE BATATA-DEXTROSE-ÁGAR (BDA) E MEIO SELETIVO (MSF) EM SEMENTES DE PEROBA ROSA.

FUNGOS	ENDOFÍTICOS		EPIFÍTICOS
	BDA	MSF	MSF
	INCIDÊNCIA**	INCIDÊNCIA*	INCIDÊNCIA**
<i>Fusarium</i> spp.	2,6 b	0,2 b	14,5 a
<i>Phomopsis</i> spp.	31,6 a	4,5 a	4,2 b

FONTE: O autor (2016).

**Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1%; *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

5.2.3 Teste de transmissão de fungos das sementes para plântulas de peroba rosa

Em todos os lotes ocorreram sintomas nas plântulas de peroba rosa associados a patógenos transmitidos por sementes (FIGURA 2). Verificou-se no lote 1, a presença de 18% de plântulas sintomáticas, seguido dos lotes 3 e 8CM com 12%. Os sintomas identificados foram necroses escuras nas raízes (FIGURA 3), manchas escuras nos cotilédones e morte de plântulas. Quanto às sementes não germinadas (SNG), o lote 7 apresentou 76%, seguido dos lotes 1 e 10 com 64% (FIGURA 2).

As plântulas com sintomas (PS) foram plaqueadas em meio BDA e as sementes não germinadas (SNG) foram colocadas em câmara úmida para identificação de fungos associados aos sintomas. Verificou-se a presença de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. em PS e SNG.

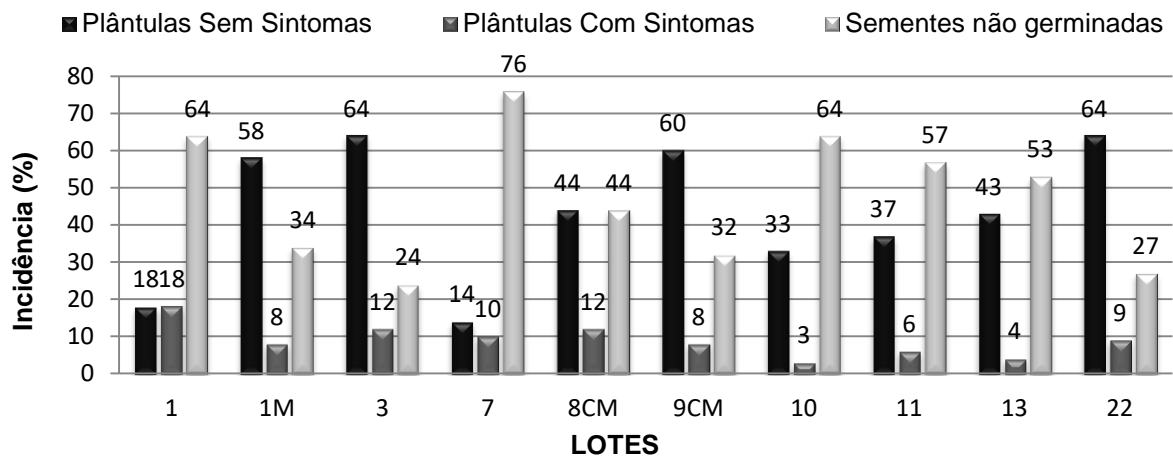


FIGURA 2: PERCENTUAL DE EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS NORMAIS E SINTOMÁTICAS E SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA, AOS 70 DIAS DA SEMEADURA NO TESTE DE TRANSMISSÃO DE FUNGOS PARA SEMENTES.

FONTE: O autor (2016).

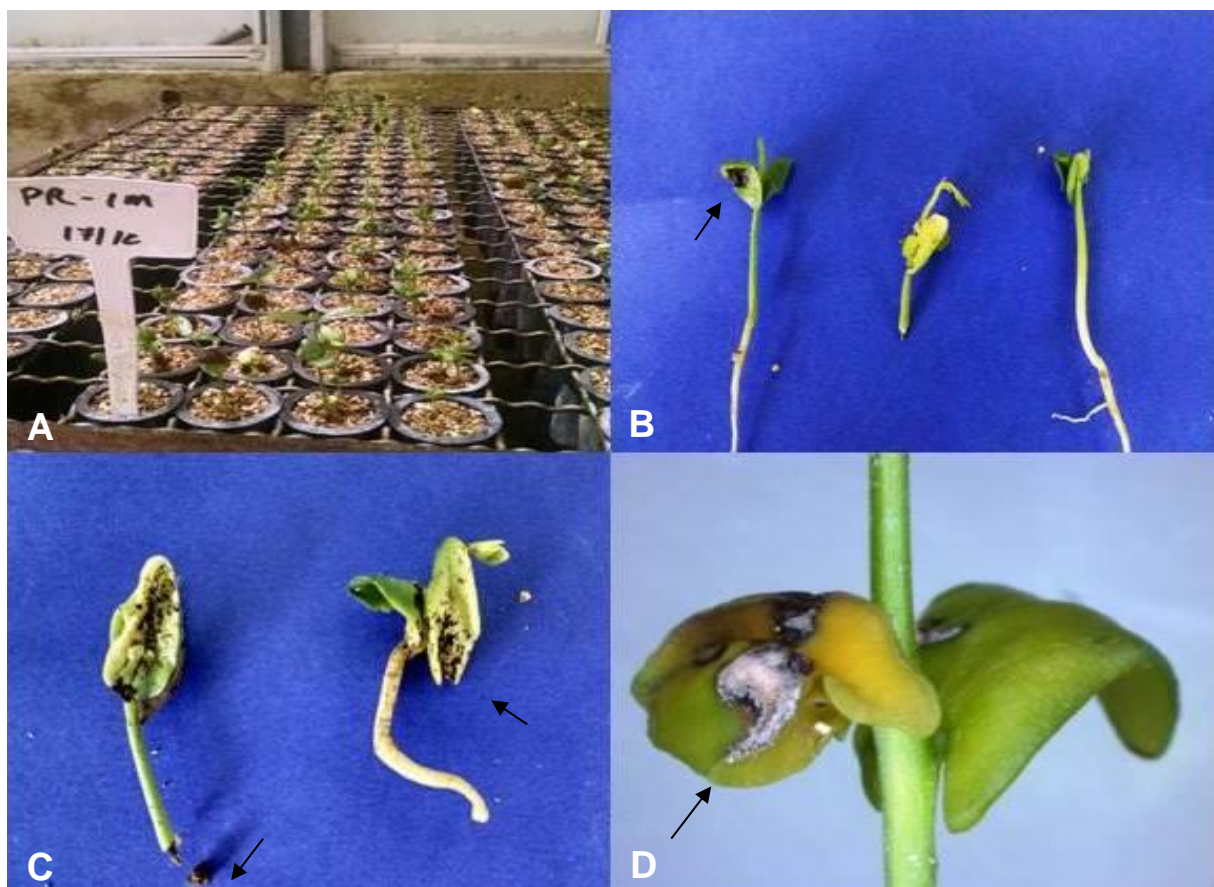


FIGURA 3: PLÂNTULAS DE PEROBA ROSA EMERGIDAS NO TESTE DE TRANSMISSÃO DE FUNGOS PARA SEMENTES. A - EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS; B - MANCHAS ESCURAS NOS COTILÉDONES; C - MANCHAS ESCURAS NOS COTILÉDONES E APODRECIMENTO DE RAÍZES; D - SINAIS (CRESCIMENTO MICELIAL ESBRANQUIÇADO) DE *Fusarium* sp. EM LESÃO NOS COTILÉDONES.

FONTE: O autor (2016).

Quanto à incidência de fungos nas sementes não germinadas, foi observado *Fusarium* spp. em todos os lotes, chegando a atingir 100% nos lotes 3, 7, 8CM e 13. A menor incidência do fitopatógeno foi verificada no lote 1M com 55,88% (TABELA 7). *Phomopsis* spp. foi encontrado em menores incidências nos lotes 1M, 3, 7, 8CM e 22, respectivamente.

TABELA 7: INCIDÊNCIA (%) de *Fusarium* spp. E *Phomopsis* spp. EM SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA, NO TESTE DE TRANSMISSÃO DE FUNGOS PARA SEMENTES.

LOTES	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Phomopsis</i> spp.
1	56,25	0,0
1M	55,88	2,94
3	100	4,16
7	100	5,26
8CM	100	2,27
9CM	84,37	0,0
10	98,43	0,0
11	94,73	0,0
13	100	0,0
22	59,25	18,51

FONTE: O autor (2016).

5.2.4 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. em sementes de peroba rosa

Os isolados de *Fusarium* spp. (TR1, TR2, TR3, TR6, TR8, TR9, TR10, TR11, TR12 e TR13) foram patogênicos à peroba rosa. Quanto à emergência de plântulas normais, foi verificado maior porcentagem nos tratamentos TR6 e TR2, com 40% e 38%, respectivamente. O tratamento TR9 apresentou a menor porcentagem de plântulas normais, com 2% de emergência e a testemunha apresentou 14% (TABELA 8).

TABELA 8: PERCENTUAL DE EMERGÊNCIA DE PLÂNTULAS SEM SINTOMAS, COM SINTOMAS E SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA, AOS 56 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO DAS SEMENTES COM *Fusarium* spp.

ISOLADOS	SEM SINTOMAS**	COM SINTOMAS**	SNG*
TESTEMUNHA	14 abc**	30 a**	56 b*
TR 1	14 abc	6 b	80 a
TR 2	38 a	8 ab	54 b
TR 3	20 abc	6 b	74 a
TR 6	40 a	6 b	54 b
TR 8	8 bc	22 ab	70 a
TR 9	2 c	22 ab	76 a
TR 10	16 abc	14 ab	70 a
TR 11	6 bc	18 ab	76 a
TR 12	34 ab	10 ab	56 b
TR 13	28 abc	16 ab	56 b

FONTE: O autor (2016).

**Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1%; *Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%.

Foi confirmado pelo reisolamento que *Fusarium* spp. causou os sintomas nas plântulas oriundas de sementes inoculadas (FIGURA 4), chegando a 100% nos tratamentos TR1, TR2, TR3, TR9, TR11 e TR13 (TABELA 9). O menor percentual de incidência de *Fusarium* spp. foi verificado no tratamento TR8 com 27,3%, enquanto a testemunha apresentou 66,7% de incidência.

Houve recuperação de *Fusarium* spp. das sementes não germinadas, com maior porcentagem em TR8 com 88,57% e o menor percentual foi em TR3 com 43,24%. A testemunha apresentou 39,29% de incidência (TABELA 9).

TABELA 9: PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DE *Fusarium* spp. NAS PLÂNTULAS COM SINTOMAS E SEMENTES NÃO GERMINADAS (SNG) DE PEROBA ROSA ORIUNDAS DO TESTE DE PATOGENICIDADE.

ISOLADOS	PLÂNTULAS COM SINTOMAS	SNG
	RECUPERAÇÃO (%)	RECUPERAÇÃO (%)
TESTEMUNHA	66,7	39,2
TR 1	100	82,5
TR 2	100	85,1
TR 3	100	43,2
TR 6	33,3	51,8
TR 8	27,3	88,5
TR 9	100	63,1
TR 10	85,7	74,2
TR 11	100	71
TR 12	80	60,7
TR 13	100	60,7

FONTE: O autor (2016).

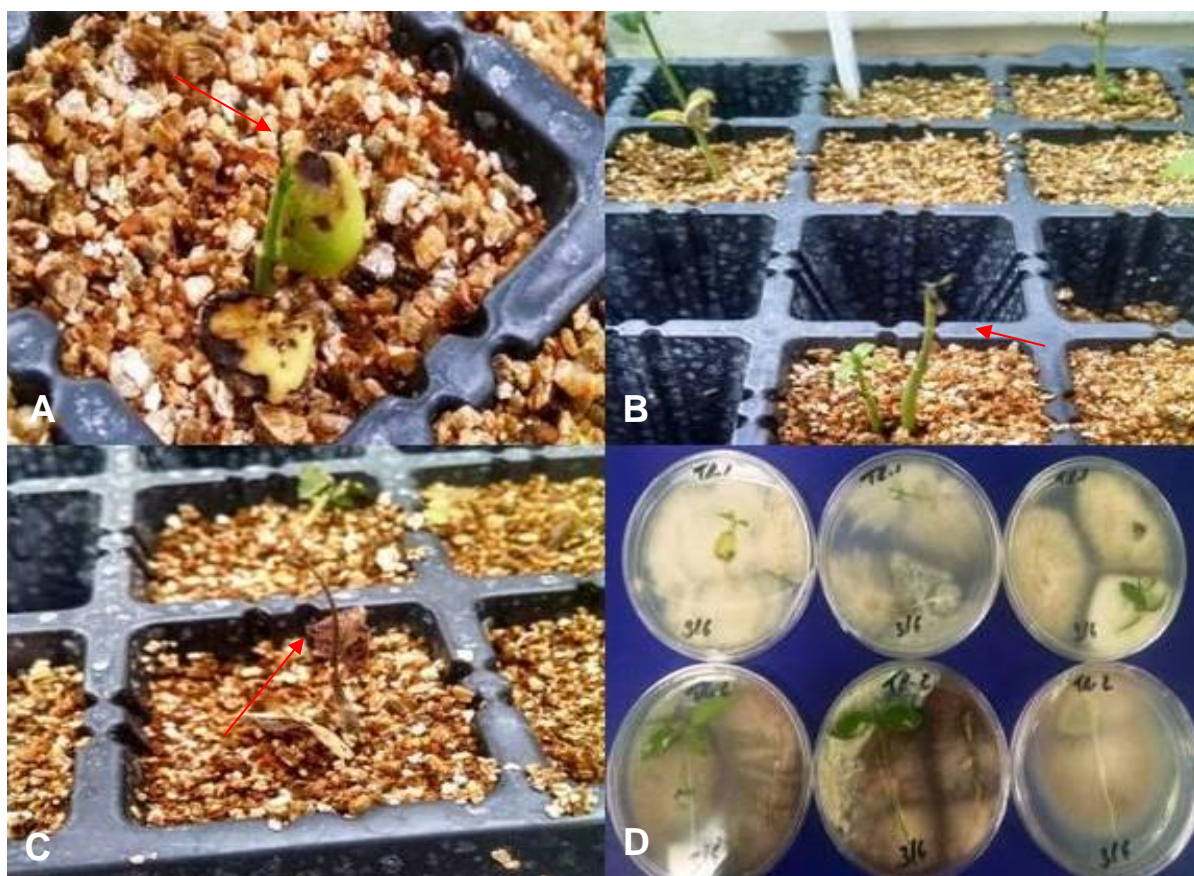


FIGURA 4: TESTE DE PATOGENICIDADE EM SEMENTES DE PEROBA ROSA. A - TOMBAMENTO DE PLÂNTULA; B E C - PLÂNTULAS MORTAS; DETECÇÃO DE *Fusarium* spp. EM PLÂNTULAS COM SINTOMAS EM MEIO BDA.

FONTE: O autor (2016).

5.2.5 Teste de patogenicidade de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. em mudas de peroba rosa.

Foram considerados patogênicos os fungos – *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. - que causaram sintomas caracterizados pelo escurecimento do limbo foliar e, às vezes, presença de sinais do patógeno. A testemunha não apresentou sintomas, sendo observada apenas a injúria provocada pelos ferimentos da inoculação (FIGURA 5).

Todos os isolados de *Fusarium* spp. foram considerados patogênicos, exceto o isolado TR-3, apresentando incidência de 30% a 100% das folhas inoculadas (TABELA 10). Vinte e seis isolados de *Phomopsis* spp. foram patogênicos à peroba rosa, apresentando de 10% a 100% de incidência nas folhas inoculadas. Seis isolados de *Phomopsis* não foram patogênicos (TABELA 11).

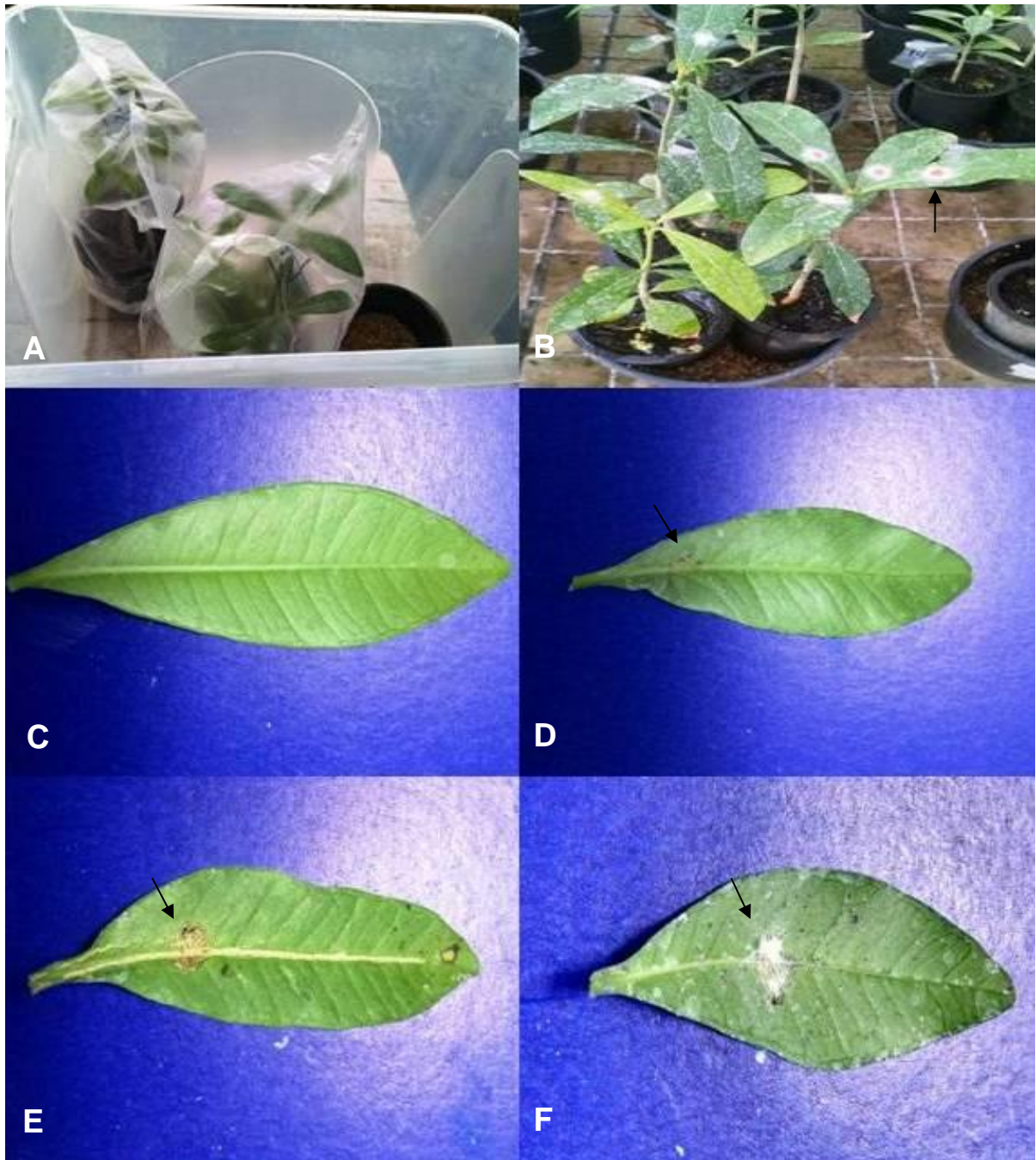


FIGURA 5: PATOGENICIDADE EM MUDAS. A - MONTAGEM DE CÂMARA ÚMIDA; B - MUDAS INOCULADAS; C - FOLHA SADIA; D - FOLHA COM INJÚRIA SEM SINTOMA; E - FOLHA COM ESCURECIMENTO DO LIMBO; F - SINAIS DO FUNGO.

FONTE: O autor (2016).

TABELA 10: PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. EM MUDAS DE PEROBA ROSA, UTILIZANDO INOCULAÇÃO DE DISCO DE BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO EM FOLHAS.

ISOLADOS	OCORRÊNCIA DE FOLHAS (%)		PATOGENICIDADE ^b
	SEM SINTOMAS	COM SINTOMAS ^a	
TESTEMUNHA	100	0	-
TR-41	0	60	+
TR-30	20	80	+
TR-7	70	30	+
TR-12	20	80	+
TR-14	40	40	+
TR-18	0	60	+
DET-59	0	80	+
TR-42	30	40	+
DET-33	40	60	+
DET-3	0	50	+
DET-51	70	30	+
TR-1	30	70	+
DET-25	0	100	+
DET-20	70	30	+
DET-46	0	100	+
DET-45	20	80	+
TR-6	60	40	+
DET-22	30	70	+
END-36	0	80	+
TR-23	0	50	+
DET-53	10	60	+
TR-3	100	0	-
END-27	20	60	+
DET-13	20	80	+
TR-8	20	60	+
TR-19	0	80	+
TR-15	0	80	+
TR-2	40	40	+

FONTE: O autor (2016).

^aEscurecimento do limbo foliar e, às vezes, presença de sinais do patógeno.

^b: (+) – Patogênico; (-) – Não patogênico

TABELA 11: PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Phomopsis* spp. EM MUDAS DE PEROBA ROSA, UTILIZANDO INOCULAÇÃO DE DISCO DE BATATA-DEXTROSE-ÁGAR COM MICÉLIO EM FOLHAS.

ISOLADOS	OCORRÊNCIA DE FOLHAS (%)		PATOGENICIDADE ^b
	SEM SINTOMAS	COM SINTOMAS ^a	
TESTEMUNHA	100	0	-
END-10	100	0	-
TR-34	90	10	+
END-49	0	100	+
DET-40	90	10	+
TR-37	80	20	+
END-54	90	10	+
TR-35	30	70	+
END-57	100	0	-
DET-7	10	70	+
END-64	80	20	+
DET-77	70	30	+
DET-10	80	20	+
END-78	0	70	+
END-41	80	20	+
DET-57	80	20	+
END-75	70	30	+
END-7	100	0	-
END-74	60	40	+
DET-67	0	100	+
END-67	40	60	+
TR-58	40	20	+
DET-1	90	10	+
TR-32	100	0	-
TR-31	60	40	+
DET-71	100	0	-
TR-40	100	0	-
END-58	90	10	+
END-24	0	100	+
TR-57	0	50	+
DET-73	0	100	+
END-72	60	40	+
END-69	50	50	+

FONTE: O autor (2016).

^aEscurecimento do limbo foliar e, às vezes, presença de sinais do patógeno.

^b: (+) – Patogênico; (-) – Não patogênico

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

5.3.1 Identificação de *Fusarium*

Com exceção do isolado de *F. equiseti* (Corda) Sacc., todos os demais apresentaram microconídios em abundância, geralmente unicelulares ou com um septo, com predominância de forma obovóide de base truncada e oval e também reniforme para os isolados de *F. oxysporum* Schlechtendahl e *F. solani* (Mart.) Sacc. Conidiogênese predominante em monofiálides; com fiálides curtas em formato de garrafa nos isolados de *F. oxysporum*; fiálides longas em *F. solani*; e presença de polifiálides em *F. fujikuroi* Nirenberg. Arranjo em falsas cabeças para todas as espécies, com exceção de *F. equiseti* que não produz microconídios e presença de cadeias longas em *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (TABELA 12).

Formação de esporodóquio de cor creme a laranja nos isolados de *F. oxysporum*, *F. solani* e *F. equiseti*. Macroconídios geralmente com três a cinco septos, predominância da forma com curvatura do lado dorsal mais pronunciada que no lado ventral, com exceção de *F. pseudocircinatum* O'Donnell & Nirenberg que apresentou curvatura dorsal e ventral; célula basal grossa e apical escassamente entalhada para os isolados de *F. solani*; célula basal distintamente entalhada e apical papilada para *F. oxysporum*; Célula basal em forma de pé e apical afilada para *F. equiseti*; Célula basal em forma de pé e apical papilada para *F. subglutinans* Wollenweber & Reinking e *F. verticillioides*; Célula basal em forma de pé e apical em forma de gancho para *F. pseudocircinatum*. O isolado de *F. fujikuroi* não formou macroconídios no meio folha-de-cravo-ágar (TABELA 12).

Presença de clamidósporo solitário, intercalar e terminal apenas nos isolados de *F. oxysporum* e *F. solani*. Os macroconídios e microconídios foram medidos com auxílio de microscópio óptico e as médias referente às espécies encontram-se na tabela 13.

TABELA 12: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. ASSOCIADOS ÀS SEMENTES DE PEROBA ROSA, FORMADOS EM MEIO FCA, A 24 °C POR 21 DIAS.

ISOLADOS	COLÔNIA	CONIDIOGÊNESE	MICROCONÍDIO	MACROCONÍDIO	CLAMIDÓSPORO	ESPÉCIE
TR-41						
TR-30						
TR-14	Crescimento		Obovóide com	Formação de		
TR-18	rápido; Micélio		base truncada,	esporodóquio de cor		
DET-59	geralmente		ovais e	creme; Conídios com		
TR-42	esparso a	Monofiálides	reniformes com	3 a 5 septos; Célula	Solitário e em pares,	<i>Fusarium solani</i>
DET-33	abundante;	longas	0 a 1 septos;	basal grossa e apical	intercalar e terminal	Martius Sacc. (1881)
TR-23	Coloração		Formados em	escassamente		
DET-53	branca e creme		falsas cabeças	entalhada		
END-27	a violácea					
DET-13						
TR-19						
TR-15						
TR-7				Formação de		
DET-25	Crescimento		Obovóide com	esporodóquio de cor		
DET-20	rápido; Micélio		base truncada,	creme a laranja;		
DET-45	abundante;	Monofiálides	ovais e	Conídios com 3 a 5	Solitário, intercalar e	<i>Fusarium oxysporum</i>
TR-6	Coloração	curtas	reniformes, sem	septos; Célula basal	terminal	Schlechtendahl (1824)
DET-22	branca a		septos;	distintamente		
TR-3	violácea		Formados em	entalhada e apical		
TR-8			falsas cabeças	papilada		
TR-2						

continua

TABELA 12: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. ASSOCIADOS AS SEMENTES DE PEROBA ROSA, FORMADOS EM MEIO FCA, A 24 °C POR 21 DIAS.

						continuação
ISOLADOS	COLÔNIA	CONIDIOGÊNESE	MICROCONÍDIO	MACROCONÍDIO	CLAMIDÓSPORO	ESPÉCIE
DET-3 DET-51	Crescimento rápido; Micélio abundante; Coloração branca a violeta	Monofiálides	Ovais e obovóide com base truncada, sem septos; Formação em falsas cabeças e cadeias longas	Não formou esporodóquio; Conídios com 3 a 5 septos; Célula basal em forma de pé e apical papilada	Ausente	<i>Fusarium verticillioides</i> (Sacc.) Nirenberg (1976)
TR-1	Crescimento rápido; Micélio abundante; Coloração violeta	Monofiálides e polifiálides	Ovais e obovóide de base truncada, sem septos; Formados em falsas cabeças	Não formou esporodóquio; Não formou macroconídios	Ausente	<i>Fusarium fujikuroi</i> Nirenberg (1976)
END-36	Crescimento rápido; Micélio abundante; Coloração branca	Monofiálides	Ausente	Formação de esporodóquio de cor laranja; Conídios com 3 a 7 septos; Célula basal em forma de pé e apical afilada	Ausente	<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc. (1886)

TABELA 12: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. ASSOCIADOS AS SEMENTES DE PEROBA ROSA, FORMADOS EM MEIO FCA, A 24 °C POR 21 DIAS..

						conclusão
ISOLADOS	COLÔNIA	CONIDIOGÊNESE	MICROCONÍDIO	MACROCONÍDIO	CLAMIDÓSPORO	ESPÉCIE
TR-12	Crescimento rápido; Micélio abundante; Coloração branca	Monofiálides	Ovais sem septos; Formados em falsas cabeças	Não formou esporodóquio; Conídios com 3 septos; Célula basal em forma de pé e apical papilada	Ausente	<i>Fusarium subglutinans</i> Wollenweber & Reinking (1983)
DET-46	Crescimento rápido; Micélio abundante; Coloração branca	Monofiálides	Ovais e obovóide de base truncada, sem septos; Formados em falsas cabeças	Não formou esporodóquio; Conídios com 3 a 5 septos; Célula basal em forma de pé e apical em forma de gancho	Ausente	<i>Fusarium pseudocircinatum</i> O'Donnell & Nirenberg (1998)

FONTE: O autor (2016).

TABELA 13: TAMANHO MÉDIO (μm) DE MACROCONÍDIOS E MICROCONÍDIOS DAS ESPÉCIES DE *Fusarium* OBTIDAS EM SEMENTES DE PEROBA ROSA, FORMADOS EM MEIO FCA.

ESPÉCIES	MICROCONÍDIOS (μm)				MACROCONÍDIOS (μm)			
	MÍNIMA	MÉDIA	MÁXIMA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMA	MÉDIA	MÁXIMA	DESVIO PADRÃO
<i>Fusarium solani</i>	8,8 ^a	15,8	25,6	3,2	39,6	66,7	91	13,9
<i>F. oxysporum</i>	7,9	14,1	23,4	2,8	33,3	50,4	70,9	10,5
<i>F. subglutinans</i>	7,6	11,3	16,3	2,2	21,2	30,8	51,4	5,9
<i>F. pseudocircinatum</i>	10,8	14,8	22,9	2,4	63,1	87,1	112,4	9,9
<i>F. verticillioides</i>	11,1	17,6	32,7	3,9	34,2	45,6	78,5	8,3
<i>F. equiseti</i>	-	-	-	-	37,6	67,6	79,9	7,7
<i>F. fujikuroi</i>	9,7	13,8	18,6	1,9	-	-	-	-

FONTE: O autor (2016).

^a: Média de 50 conídios.

As medidas obtidas dos microconídios e macroconídios referente às sete espécies de *Fusarium* identificadas estão de acordo com os valores descritos na literatura especializada (LESLIE e SUMMERELL, 2006). As características dos macroconídios (célula apical, célula basal e número de septos) e microconídios referente às espécies identificadas podem ser observadas nas figuras 6 a 8.

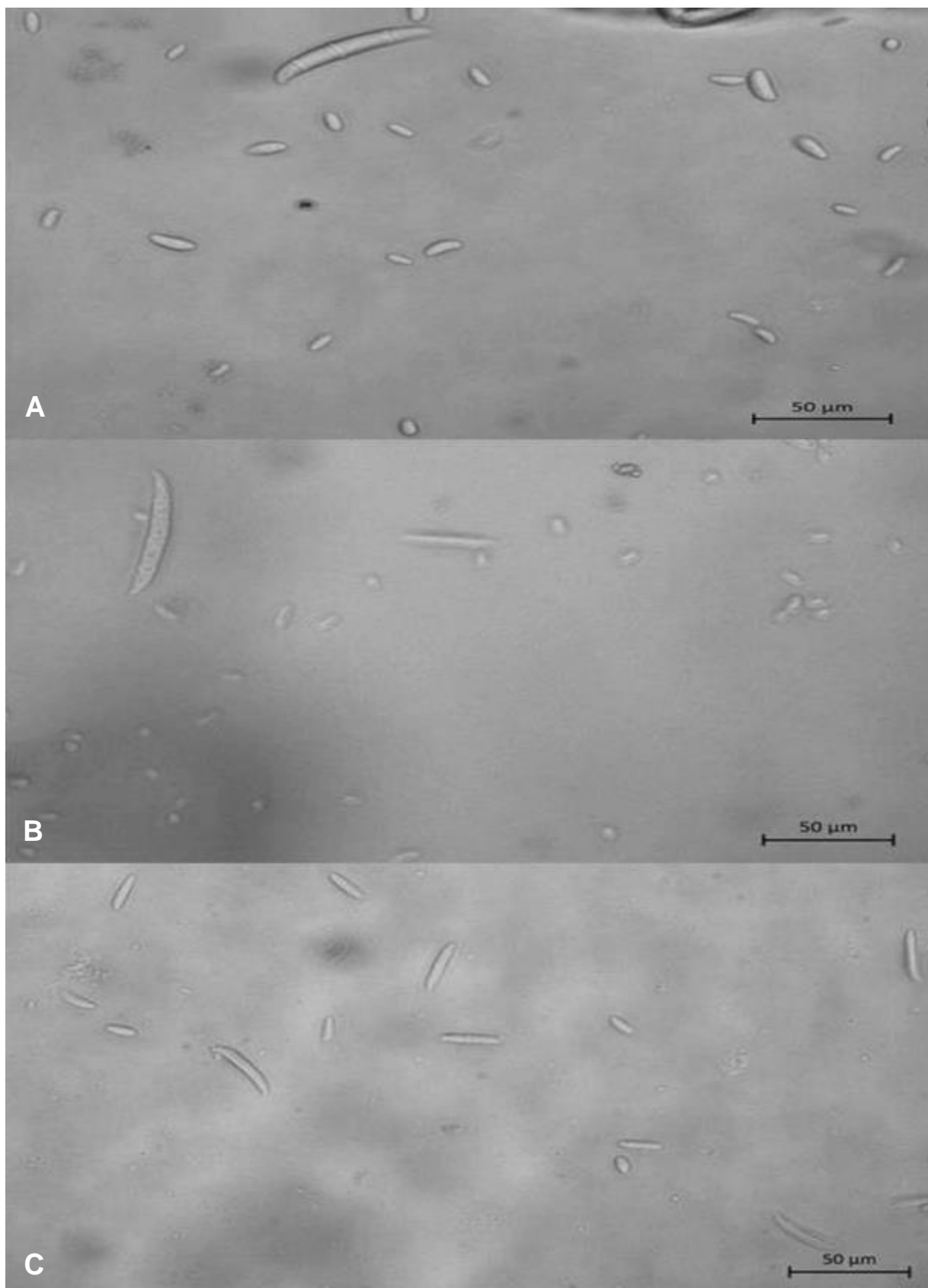


FIGURA 6: CONÍDIOS. A - MACRO E MICROCONÍDIOS DE *Fusarium solani*, B - MACRO E MICROCONÍDIOS DE *Fusarium oxysporum*; C - MACRO E MICROCONÍDIOS DE *Fusarium subglutinans*.

FONTE: O autor (2016).

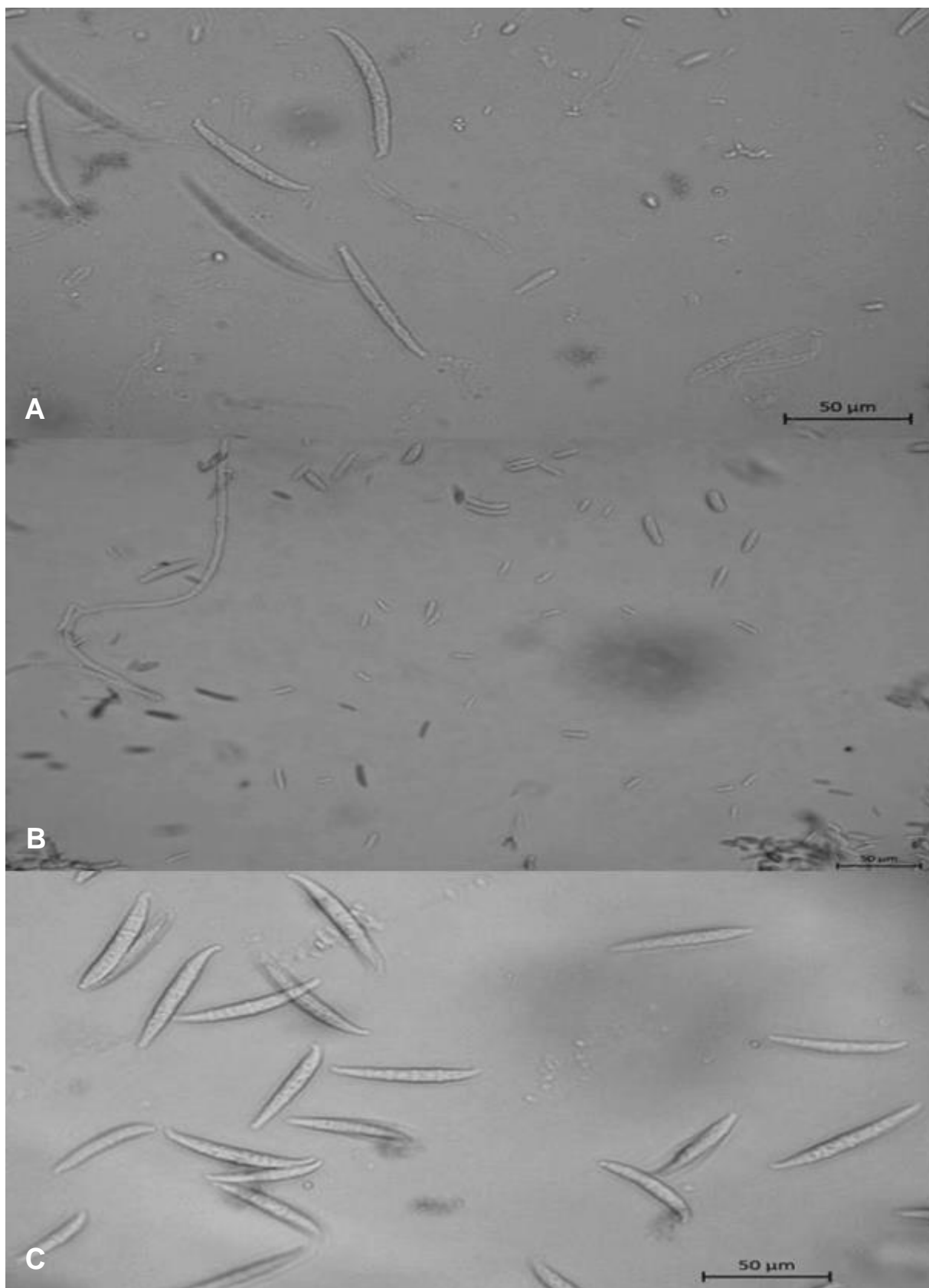


FIGURA 7: CONÍDIOS. A - MACRO E MICROCONÍDIOS DE *Fusarium pseudocircinatum*, B - MACRO E MICROCONÍDIOS DE *Fusarium verticillioides*; C - MACROCONÍDIOS DE *Fusarium equiseti*.

FONTE: O autor (2016).

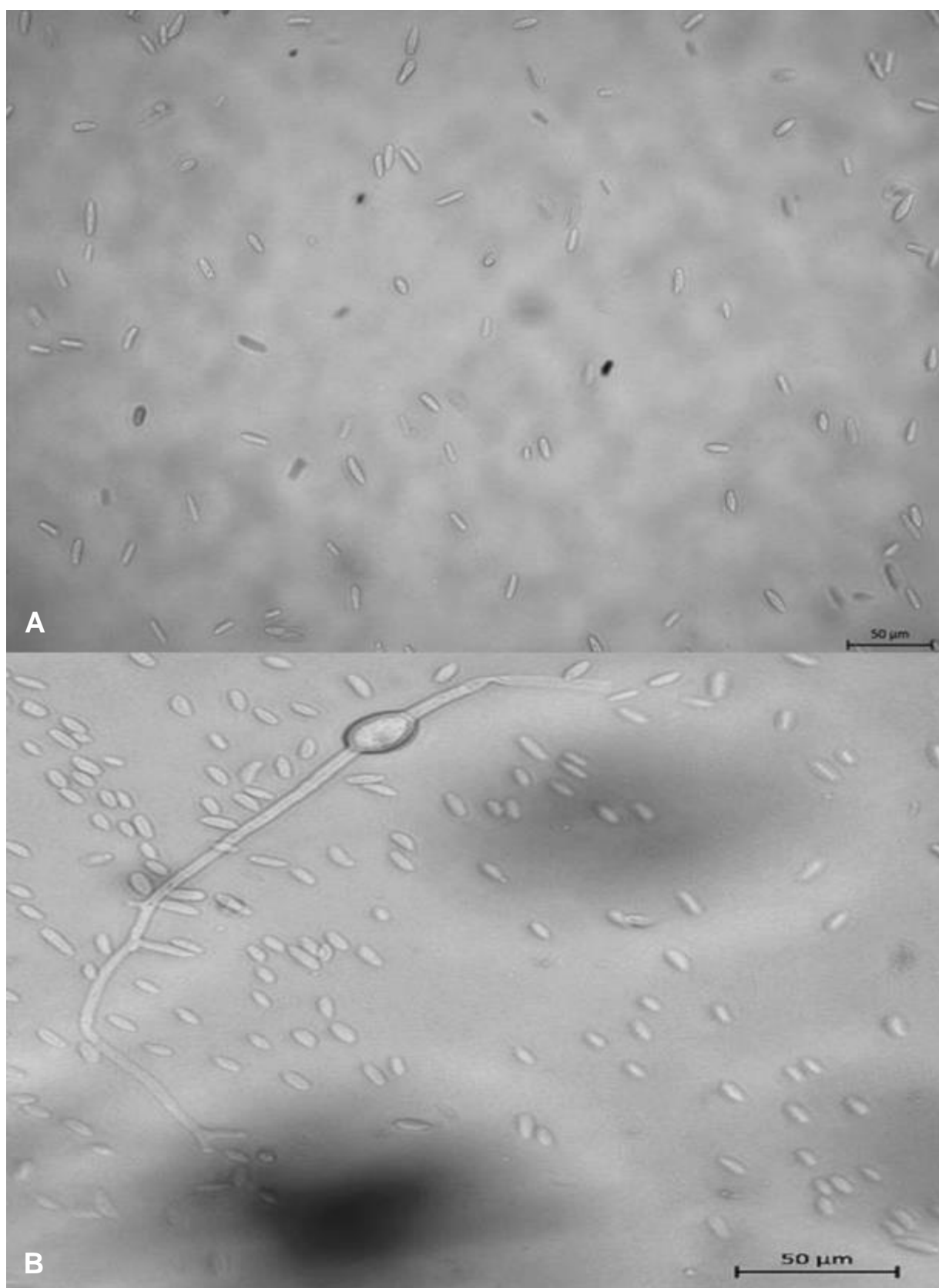


FIGURA 8: CONÍDIOS. A - MICROCONÍDIOS DE *Fusarium fujikuroi*, B – CLAMIDÓSPORO INTERCALAR, FIÁLIDES CURTAS E MICROCONÍDIOS DE *Fusarium oxysporum*.

FONTE: O autor (2016).

5.3.2 Caracterização de *Phomopsis* spp.

O diâmetro médio das colônias após cinco dias de crescimento em meio BDA foi calculado e o isolado DET-7 apresentou o menor diâmetro dentre os demais, com apenas 33,5 mm, enquanto o isolado END-10 atingiu os bordos da placa com 90 mm (FIGURA 9).

Quanto à coloração das colônias, os isolados apresentaram o verso e reverso da cultura nas placas de Petri em meio BDA predominantemente branco, com o centro da colônia apresentando variação entre verde claro a oliva, marrom, cinza e creme. Apenas o isolado TR-58 apresentou o verso com coloração verde escuro e reverso negro (TABELA 14).

Todos os isolados apresentaram micélio algodinoso em meio BDA. Foi observada a presença de micélio abundante na maioria dos isolados, com variação para esparso em apenas oito isolados. Foi verificado o aspecto dos bordos das colônias e todos os isolados apresentaram bordos irregulares, exceto o isolado END-10, que apresentou bordos regulares (TABELA 14).

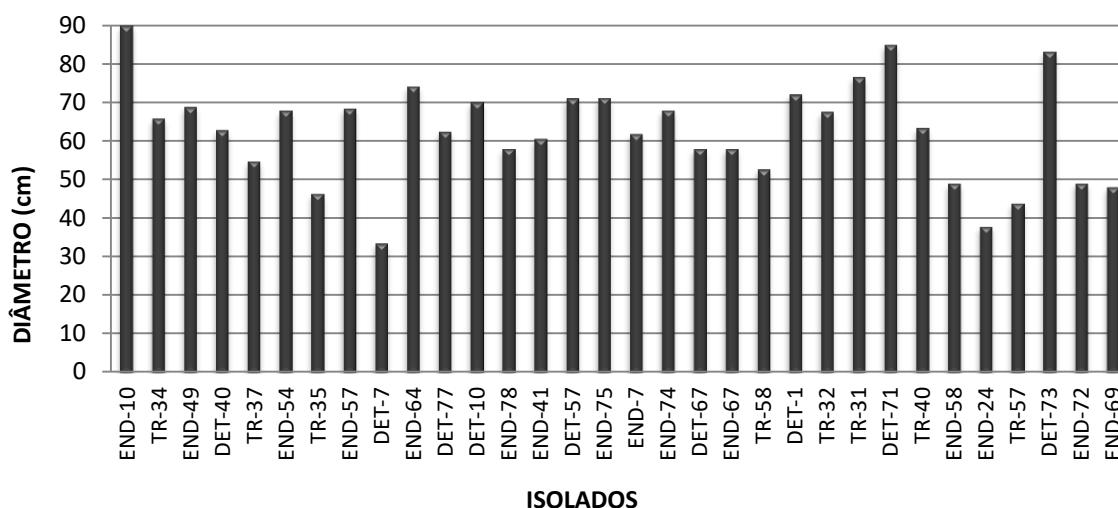


FIGURA 9: DIÂMETRO MÉDIO (mm) DAS COLÔNIAS DE *Phomopsis* spp. EM MEIO BDA, APÓS 5 DIAS DE CRESCIMENTO, a 24 °C.

FONTE: O autor (2016).

TABELA 14: CARACTERIZAÇÃO MACRO E MICROMORFOLÓGICA DE COLÔNIAS DE *Phomopsis* spp. ASSOCIADOS AS SEMENTES DE PEROBA ROSA, EM MEIO BDA, A 24 °C, COM FOTOFASE DE 12 HORAS, POR 21 DIAS.

ISOLADO	COLORAÇÃO		MICÉLIO AÉREO	CONÍDIOS
	VERSO	REVERSO		
END-10	Branco	Branco, centro verde claro	Abundante	Alfa e Beta
TR-34	Branco	Branco a creme	Abundante	Beta
END-49	Branco	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
DET-40	Branco	Branco, centro marrom	Abundante	Beta
TR-37	Branco	Branco, centro verde	Esparso	Alfa
END-54	Branco, centro cinza	Branco, centro verde escuro	Abundante	Alfa e Beta
TR-35	Branco, centro verde	Branco, centro verde azulado	Esparso	Alfa e Beta
END-57	Branco a creme	Branco a creme	Esparso	Beta
DET-7	Branco	Verde pálido	Esparso	Alfa e Beta
END-64	Branco	Branco a creme	Abundante	Beta
DET-77	Branco	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
DET-10	Branco	Branco, centro verde claro	Abundante	Alfa e Beta
END-78	Branco	Branco, centro verde claro	Abundante	Alfa e Beta
END-41	Branco	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
DET-57	Branco, centro verde	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
END-75	Branco	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
END-7	Branco	Branco a creme	Abundante	Alfa e Beta
END-74	Branco	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
DET-67	Branco, centro cinza	Branco, centro verde escuro	Abundante	Beta
END-67	Branco	Branco, centro verde/cinza	Abundante	Beta
TR-58	Verde escuro	Verde escuro a negro	Esparso	Não formou
DET-1	Branco	Branco, centro escurecido	Abundante	Beta
TR-32	Branco, centro verde	Branco, centro verde	Abundante	Beta
TR-31	Branco	Branco, centro verde escuro	Abundante	Beta
DET-71	Branco, centro verde	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
TR-40	Branco	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
END-58	Branco, centro verde	Branco, centro verde	Esparso	Alfa e Beta
END-24	Branco, centro verde	creme, centro verde escuro	Esparso	Alfa e Beta
TR-57	Branco, centro verde	Branco, centro verde	Esparso	Alfa e Beta
DET-73	Branco, centro cinza	Branco, centro verde oliva	Abundante	Beta
END-72	Branco	Branco, centro verde	Abundante	Alfa e Beta
END-69	Branco, centro verde	Branco, centro cinza	Abundante	Beta

FONTE: O autor (2016).

A presença de picnídios foi observada entre 14 e 21 dias na maioria das colônias mantidas sob luz contínua e temperatura de 24°C. O isolado TR-37 apresentou apenas conídios alfa. Os conídios alfa apresentaram aspecto oval, sem a presença de septos. Com exceção dos isolados TR-58 e TR-37 todos os demais

isolados formaram beta conídios, com característica filiforme e com curvatura na extremidade. Os isolados TR-34, DET-40, END-57, END-64, DET-67, END-67, DET-1, TR-32, TR-31, DET-73 e END-69 formaram apenas beta conídios. Os demais isolados apresentaram os dois tipos de conídios alfa e beta (FIGURA 10).

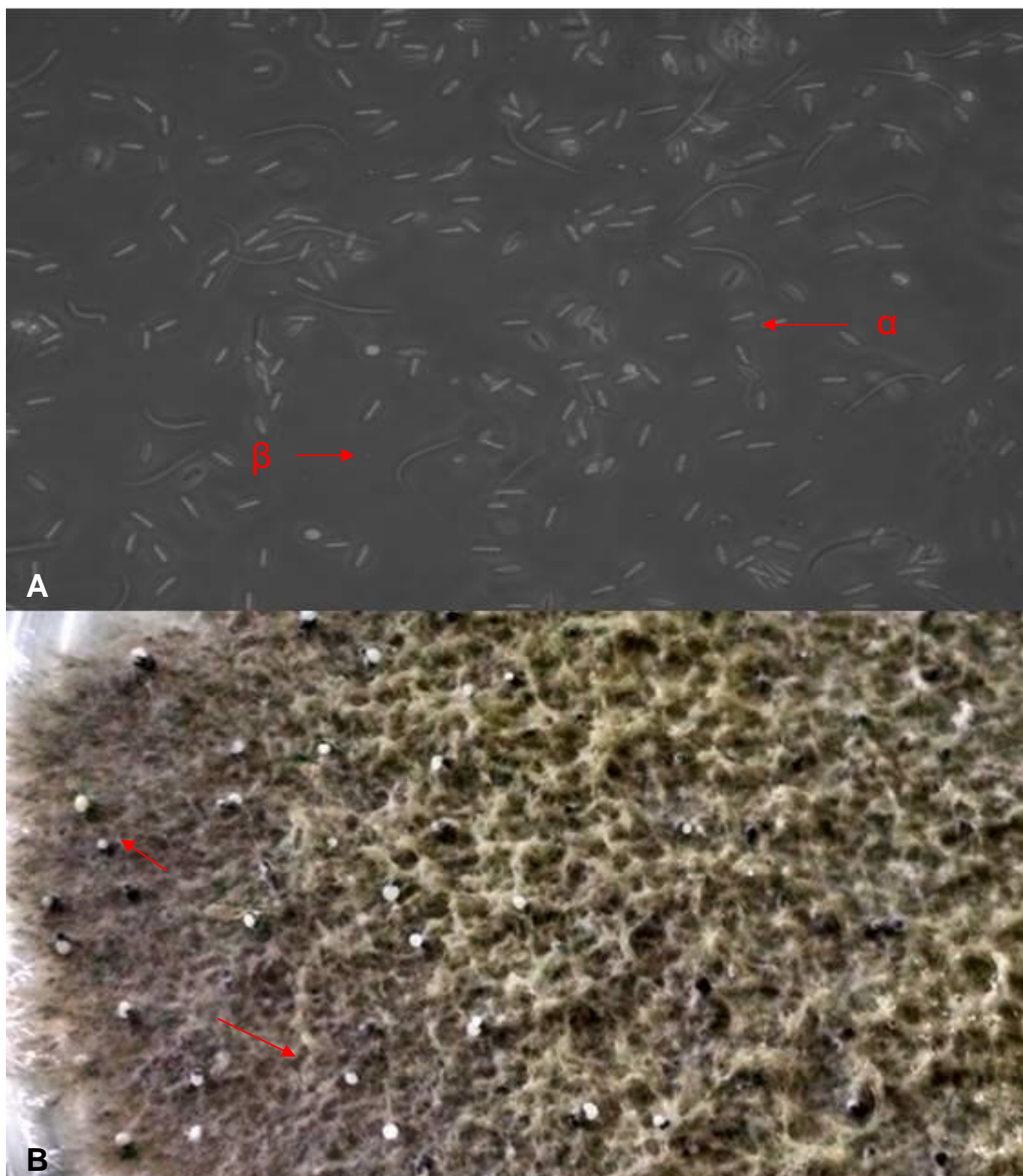


FIGURA 10: COLÔNIA DE *Phomopsis* spp. A - ALFA E BETA CONÍDIOS; B – PICNÍDIOS.

FONTE: O autor (2016).

5.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Fusarium* spp. E *Phomopsis* spp.

Foram selecionados 60 isolados de *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. para as análises moleculares. Deste total, 28 isolados correspondem ao gênero *Fusarium* e 32 ao gênero *Phomopsis*.

Utilizando a região ITS para identificação de *Fusarium*, foi possível identificar 17 isolados no nível de espécie e dois apenas ao nível de gênero. Os isolados identificados correspondem a seis espécies de *Fusarium*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi* (TABELA 16). Com a região do fator de elongação 1-alpha foi possível identificar 27 entre 28 isolados de *Fusarium*, divididos entre sete espécies diferentes, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi*, *F. pseudocircinatum* e *F. subglutinans* (TABELA 15).

Quanto à *Phomopsis*, com a região ITS e EF-1 α foi possível realizar a identificação de 20 entre 32 isolados, porém, não foi possível determinar a espécie para a maioria dos isolados. Foram identificados 3 isolados correspondentes a *Diaporthe paranensis*, 1 *Diaporthe oxe* e os outros 16 foram identificados apenas como *Phomopsis* sp. (TABELA 16).

TABELA 15: SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE *Fusarium* spp. DE PEROBA ROSA, MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DAS REGIÕES ITS1-5.8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL E FATOR DE ELONGAÇÃO 1-ALPHA (EF-1 α).

ISOLADOS	ITS		FATOR DE ELONGAÇÃO	
	ESPÉCIE	IDENTIDADE (%)	ESPÉCIE	IDENTIDADE (%)
TR-41	<i>F. solani</i>	100	<i>F. solani</i>	98
TR-30	-	-	<i>F. solani</i>	94
TR-7	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	99
TR-12	<i>F. subglutinans</i>	99	<i>F. subglutinans</i>	99
TR-14	<i>F. solani</i>	87	<i>F. solani</i>	96
TR-18	-	-	<i>F. solani</i>	99
DET-59	<i>F. solani</i>	99	<i>F. solani</i>	98
TR-42	<i>Fusarium</i> sp.	89	<i>F. solani</i>	97
DET-33	<i>F. solani</i>	99	<i>F. solani</i>	97
DET-3	<i>F. verticillioides</i>	100	<i>F. verticillioides</i>	99
DET-51	<i>F. verticillioides</i>	100	<i>F. verticillioides</i>	100
TR-1	<i>F. fujikuroi</i>	100	<i>F. fujikuroi</i>	99
DET-25	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	98
DET-20	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	99
DET-46	<i>Fusarium</i> sp.	100	<i>F. pseudocircinatum</i>	98
DET-45	-	-	<i>F. oxysporum</i>	99
TR-6	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	99
DET-22	<i>F. oxysporum</i>	100	<i>F. oxysporum</i>	99
END-36	<i>F. equiseti</i>	97	<i>F. equiseti</i>	95
TR-23	<i>F. solani</i>	99	-	-
DET-53	-	-	<i>F. solani</i>	99
TR-3	-	-	<i>F. oxysporum</i>	100
END-27	-	-	<i>F. solani</i>	98
DET-13	-	-	<i>F. solani</i>	99
TR-8	-	-	<i>F. oxysporum</i>	99
TR-19	<i>F. solani</i>	99	<i>F. solani</i>	98
TR-15	<i>F. solani</i>	98	<i>F. solani</i>	98
TR-2	-	-	<i>F. oxysporum</i>	99

FONTE: O autor (2016).

TABELA 16: SIMILARIDADE DE ISOLADOS DE *Phomopsis* sp. DE PEROBA ROSA, MEDIANTE COMPARAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DAS REGIÕES ITS1-5.8S-ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL E FATOR DE ELONGAÇÃO 1-ALPHA (EF-1 α).

ISOLADOS	ITS		FATOR DE ELONGAÇÃO	
	ESPÉCIE	IDENTIDADE (%)	ESPÉCIE	IDENTIDADE (%)
END-10	-	-	-	-
TR-34	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	89
END-49	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	82
DET-40	<i>Phomopsis</i> sp.	98	<i>Phomopsis</i> sp.	86
TR-37	<i>Phomopsis</i> sp.	98	<i>Phomopsis</i> sp.	85
END-54	<i>Phomopsis</i> sp.	98	<i>Phomopsis</i> sp.	86
TR-35	<i>Diaporthe paranensis</i>	97	-	-
END-57	-	-	-	-
DET-7	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	86
END-64	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	82
DET-77	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	87
DET-10	-	-	-	-
END-78	-	-	-	-
END-41	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	82
DET-57	-	-	-	-
END-75	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	82
END-7	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	82
END-74	-	-	-	-
DET-67	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	88
END-67	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	82
TR-58	-	-	-	-
DET-1	<i>Diaporthe paranensis</i>	97	<i>Diaporthe paranensis</i>	85
TR-32	-	-	-	-
TR-31	-	-	-	-
DET-71	-	-	-	-
TR-40	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	89
END-58	<i>Diaporthe paranensis</i>	97	<i>Diaporthe paranensis</i>	83
END-24	-	-	<i>Diaporthe paranensis</i>	85
TR-57	<i>Diaporthe.oxe</i>	98	<i>Diaporthe.oxe</i>	100
DET-73	<i>Phomopsis</i> sp.	99	<i>Phomopsis</i> sp.	82
END-72	-	-	-	-
END-69	<i>Phomopsis</i> sp.		<i>Phomopsis</i> sp.	88

FONTE: O autor (2016).

6 DISCUSSÃO

Os dados obtidos com este estudo trazem informações inéditas quanto a diversidade fúngica associada às sementes como endófitos e fitopatógenos. Além disso, características como transmissibilidade e patogenicidade dos fungos foram verificadas para determinar se há interferência na qualidade fisiológica das sementes.

Neste trabalho a germinação das sementes de peroba rosa variou de 9,3% a 60%, com os maiores valores para os lotes 1M, 3, 8CM e 22. Carvalho (2004) propõe a média de germinação de sementes de peroba rosa entre 35 e 70%. No entanto, por tratar-se de uma espécie nativa, a peroba rosa apresenta uma germinação irregular como observado neste trabalho. Ramos *et al.* (1995) obteve 67% de germinação para peroba rosa nas mesmas condições utilizadas neste trabalho. Quanto a germinação da família Apocynaceae, Oliveira *et al.* (2011) obteve 91% de germinação em sementes de *Aspidosperma tomentosum* à 25°C e Oliveira *et al.* (2015) obteve 90% de germinação em sementes de *Aspidosperma subincanum* na mesma temperatura.

Segundo Vieira e Carvalho (1994), as amostras de sementes que apresentam maior número de plântulas normais na primeira contagem, maior velocidade na germinação e maior comprimento médio de parte aérea e raiz das plântulas normais, são as mais vigorosas. No entanto, desconhece-se estas informações para peroba rosa.

A primeira contagem demonstra o número de plântulas normais formadas aos 12 dias do teste de germinação e obteve variação de 0,17 plântulas no lote 10 a 10,5 plântulas no lote 1M. O índice de velocidade de germinação informa o número médio de sementes germinadas em um menor espaço de tempo, considerando que quanto maior o valor obtido melhor o vigor da semente. O IVG variou de 1,51 no lote 10 a 11,82 no lote 3. Os parâmetros avaliados para vigor de sementes de peroba rosa, não foram encontrados para a espécie na literatura e foram comparados com outras espécies florestais.

Leite *et al.* (2012) avaliaram a qualidade fisiológica de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia*) e obtiveram valores similares aos encontrados para peroba rosa, verificando germinação entre 44 e 69%, primeira contagem com variação de 5,25 a 13,5 plântulas normais e IVG entre 6,10 e 8,65. Valores compatíveis com

nossos achados foram encontrados por Lazarotto *et al.* (2013) que obtiveram entre 22 e 64% de plântulas normais na primeira contagem em sementes de *Cedrela fissilis* e Mondo *et al.* (2008) que avaliou a qualidade fisiológica de sementes de angico-vermelho e obteve os resultados de 71% de germinação e IVG de 15,4.

Os resultados mostram a presença de fungos endofíticos e epifíticos em sementes de peroba rosa, especialmente dos gêneros *Fusarium* e *Phomopsis*. De acordo com Nascimento *et al.* (2006), os relatos sobre a ocorrência de fungos com potencial fitopatogênico em sementes de espécies florestais, tanto interna quanto externamente, são escassos.

O meio MSF foi utilizado neste trabalho para facilitar o isolamento deste gênero, uma vez que diminui a contaminação com outros fungos e bactérias (ANDERSON, 1986). Com a utilização deste meio de cultura nos testes de detecção de fungos endofíticos e epifíticos, foi possível verificar que *Fusarium* spp. está presente nas sementes de peroba rosa tanto como epifítico, em sua maioria, bem como endófito.

O gênero *Fusarium* foi encontrado como endófito em BDA, porém, em valores baixos, chegando ao máximo de 7%. No entanto, como epifítico *Fusarium* foi encontrado em meio seletivo em todos os lotes, exceto no lote 10, apresentando 52% de incidência. Há relatos de *Fusarium* spp. como endófito em sementes de caupi, com frequência de 0,13 a 6,33% (RODRIGUES e MENEZES, 2002), corroborando com os valores obtidos para peroba rosa.

Quanto à associação de patógenos associados com sementes da família Apocynaceae, foi encontrado relatos de *Fusarium oxysporum* em sementes de peroba amarela (*Aspidosperma ramiflorum*) (CARNEIRO, 1990); Em *Aspidosperma* sp. foi encontrado *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Epicocum* sp., *Pestalotia* sp., *Phoma* sp. e *Rhizoctonia* sp. (NETTO e FAIAD, 1995); Em mangaba (*Hancornia speciosa*) foi verificado a presença de *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Pestalotia* sp. e *Rhizopus* sp. (BARROS *et al.*, 2004). No entanto, apenas os gêneros *Fusarium* e *Rhizopus* são fitopatógenos comuns à peroba rosa.

Fusarium spp. tem sido encontrado associado com sementes de outras espécies florestais. Carneiro (1990) avaliou a qualidade sanitária de sementes de onze espécies florestais nativas e verificou a associação de *Fusarium* sp. com as

seguintes espécies: peroba amarela (*Aspidosperma ramiflorum*), aroeira (*Astronium urundeuva*), angico-do-campo (*Piptadenia macrocarpa*), algaroba (*Prosopis juliflora*), carvoeiro (*Sclerolobium paniculatum*) e ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*). Tal relato corrobora com nossa afirmação de que *Fusarium* spp. está associado as sementes de peroba rosa.

O gênero *Phomopsis* foi encontrado como endófito em valores altos, chegando ao máximo de 65%. Enquanto que, como epifítico *Phomopsis* spp. foi encontrado em 50% dos lotes, atingindo apenas 25% de incidência. Assim como verificado em sementes de peroba rosa, a associação de *Phomopsis* sp. com sementes de espécies florestais é confirmada por Walker *et al.* (2013), que obteve incidência do gênero de até 100% em sementes de angico-vermelho, e Lazarotto *et al.* (2012) que verificaram a presença de *Phomopsis* sp. em todas as amostras de sementes de *Cedrela fissilis* avaliadas, apresentando incidência de até 30,5% em papel filtro e 19% em BDA.

Alguns autores (GARZONIO e MCGEE, 1983; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015) relatam que, os fungos do gênero *Phomopsis* colonizam os tecidos do hospedeiro muito cedo e estabelecem relações como endófito, saprófita ou parasita, estando associados as sementes, que são a principal forma de dispersão do patógeno a longas distâncias. Entretanto, a taxa de transmissão dos fungos pela semente é baixa (GARZONIO e MCGEE, 1983; HERNÁNDEZ *et al.*, 2015).

Há relatos do gênero *Phomopsis* associado como endófito em uma ampla variedade de plantas, entre elas, *Sabal bermudana*, *Trachycarpus fortunei* (palmeira-moinho-de-vento-chinesa), *Cavendishia pubescens* (uva de monte), *Stylosanthes guianensis* (mineirão), *Anacardium occidentale* (cajuero) e *Mangifera indica* (mangueira) (AZEVEDO *et al.*, 2000). Em plantas medicinais, *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta) (SIQUEIRA *et al.*, 2011), *Cassia spectabilis* (Cássia) (SILVA *et al.*, 2005), *Luehea divaricata* (açoita-cavalo) (BERNARDI-WENZEL *et al.*, 2010), *Spondias mombin* (cajá) e *Aspidosperma tomentosum* (peroba-do-cerrado) (CORRADO e RODRIGUES, 2004).

A transmissão de fungos das sementes para plântulas de peroba rosa, foi observada neste trabalho pela presença de manchas necróticas em cotilédones, necrose de raízes e morte de plântulas, estando associadas à *Fusarium* spp. e *Phomopsis* spp. Segundo Silva *et al.* (2006), os fungos endofíticos podem ser considerados como patógenos latentes, e dependendo das condições ambientais e

estado fisiológico do hospedeiro, podem causar doença. Resultados semelhantes foram observados por Benetti *et al.* (2009) e Lazarotto *et al.* (2012) que verificaram a transmissão de *Fusarium* sp. via semente para plântulas de cedro (*Cedrella fissilis*); Lazarotto *et al.* (2010) constatou a transmissão e patogenicidade de *Fusarium* em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*).

Quanto à transmissão de *Phomopsis* sp. em sementes florestais, há relatos do gênero em sementes de Jacarandá-da-Bahia, causando deterioração da qualidade e apodrecimento das sementes (VECHIATO e PARISI, 2013); Associado a sementes de baru (*Dipteryx alata*) e caroba (*Cybistax antisyphilitica*) (SANTOS, 1996); Causando mancha foliar em aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) (ANJOS *et al.*, 2001) e mangaba (*Harconia speciosa*) (ANJOS *et al.*, 2009). Podridão de sementes e morte em pós-emergência de urucum (*Bixa orellana*) (KRUPPA *et al.*, 2012) e angico (*Piptadenia paniculata*) (STRAPASSON *et al.*, 2002).

Vinte e sete isolados de *Fusarium* spp. e vinte e seis isolados de *Phomopsis* spp. foram patogênicos às mudas de peroba rosa, causando lesões nas folhas inoculadas. O gênero *Fusarium* tem sido um dos maiores problemas fitossanitários para espécies florestais. Em erva-mate, a podridão de raízes pode ser causada por diversas espécies como, *Fusarium oxysporum* Schlecht., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Fusarium decemcellulare* Brick, *Fusarium tabacinum* (Beyma) W. Gams e *Fusarium tricinctum* (Corda), destas espécies, *F. oxysporum* e *F. solani* são as mais virulentas (POLETTTO *et al.*, 2010).

Em mudas de erva-mate cultivadas em viveiro, foram relatados *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* por Poletto *et al.* (2012) como espécies patogênicas causando podridão de raízes. O mesmo sintoma foi verificado em plântulas de peroba rosa em nosso experimento de patogenicidade com dez isolados de *Fusarium* spp. inoculados em sementes, mostrando que o gênero causa podridão de raízes em peroba rosa.

A amplificação da região ITS por PCR é bastante utilizada para taxonomia de fungos. Em eucariotos este marcador se repete por diversas vezes e consiste de regiões codificadas para os genes RNAr 18S, 5.8S e 28S e dois espaços internos (ITS 1 e ITS 2) que separam essas regiões. Essa região apresenta variabilidade moderada e pode ser utilizada para a diferenciação em nível de gênero e espécie (FOULLY *et al.*, 1997).

Baseado nas características morfológicas e nas análises moleculares foram identificadas 7 espécies de *Fusarium* associadas as sementes de peroba rosa, conforme segue: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi*, *F. pseudocircinatum* e *F. subglutinans*. Estas características estão de acordo com Ventura (1999).

Utilizando a região ITS foi possível identificar 17 isolados em nível de espécie e 2 apenas ao nível de gênero. A região do fator de elongação 1-alpha se mostrou mais específica para a identificação do gênero, a qual foi possível identificar 27 entre 28 isolados de *Fusarium*, divididos entre 7 espécies diferentes, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi*, *F. pseudocircinatum* e *F. subglutinans*. Os resultados obtidos com a caracterização morfológica estão de acordo com a caracterização molecular.

As espécies de *Fusarium* - *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, *F. fujikuroi*, *F. pseudocircinatum* e *F. subglutinans* - são descritas pela primeira vez em associação patogênica com sementes de peroba rosa. Conforme demonstrado este gênero pode causar tombamento pré e pós-emergente, necrose de cotilédones, podridão de raízes e morte de plântulas de peroba rosa.

O gênero *Phomopsis* é caracterizado pela formação de picnídios escuros, com ostíolo normalmente em forma de pêra, conidióforos simples, alfa conídios hialinos com gotas nas extremidades, predominantemente elipsóides, sem septos, unicelulares de forma ovóide. São formados também beta conídios hialinos, sem gotas, filiformes, a maioria curvos em uma das extremidades, sem septos (HANLIN e MENEZES, 1996). As características morfológicas descritas no trabalho não foram suficientes para identificação específica de *Phomopsis*. Devido às dificuldades na identificação do complexo *Phomopsis/Diaporthe*, a classificação das espécies desse gênero tem se baseado em características morfológicas e, principalmente, em filogenias moleculares, especialmente as sequências da região ITS do DNA e sequência parcial do gene que codifica o fator de elongação 1-alpha (EF-1 α) (GOMES *et al.*, 2013).

Neste trabalho, os isolados de *Phomopsis* spp. foram submetidos a análise molecular por amplificação da região ITS e EF-1 α . Foi possível identificar 20 entre 32 isolados de *Phomopsis*, com a região ITS e EF-1 α , sendo três como *D. paranensis*, um como *D. oxe* e os demais apenas como *Phomopsis* sp.

7 CONCLUSÕES

As sementes de peroba rosa apresentaram uma baixa qualidade fisiológica, com germinação máxima de 60%, o que é comum para espécies florestais nativas, por geralmente não apresentarem técnicas de silvicultura.

Os fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Trichoderma* sp., *Phomopsis* sp. e *Fusarium* spp. foram encontrados tanto como endofíticos, quanto como epifíticos em sementes de peroba rosa.

As espécies de *Fusarium* associadas com sementes de peroba rosa foram identificadas como: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium pseudocircinatum* e *Fusarium subglutinans*.

Diaporthe paranensis e *Diaporthe oxe* estão presentes em sementes de peroba rosa.

Fusarium spp. e *Phomopsis* spp. são patogênicos à peroba rosa e foram transmitidos das sementes para as plântulas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A.F.B.; BIAVA, M. Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na Região Sul de Minas Gerais. **Santo Antônio do Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. (Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, 6)**
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. Fourth edition. John Wiley e Sons, New York, p.869, 1996.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**. v.41, n.1, p.1 – 16, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAD, A.; J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.90, p.1829 – 1845, 2011.
- ANJOS, J.R.N. dos; CHARCHAR, M.J.d'A; GUIMARÃES, D.P. Ocorrência de queima das folhas causada por *Phomopsis* sp. em aroeira no distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.6, p.649-650, 2001.
- ANJOS, J.R.N. dos; CHARCHAR, M.J.d'A; LEITE, R.G.; SILVA, M.S. Levantamento e patogenicidade de fungos associados às sementes de mangaba (*Harconia speciosa*) no cerrado do Brasil Central. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-Sp, v.31, n.3, p.911-915, 2009.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHAHG, J.; ZHAHG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMORIN, L.; KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Volume 1: Princípios e Conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. 913 p.
- ANDERSON, R. L. A new method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Plant Disease**, Saint paul, v. 70, n. 5, p. 452-453, 1986.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUBLINCKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P. T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CalQ, 2002.86 p

ARAÚJO, E.R. **Qualidade fisiológica, etiologia e patogenicidade de fungos assinalados em sementes de aroeira produzidas em três municípios da Paraíba.** 2008. 45f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2008.

AZEVEDO, J. L.; JÚNIOR, W. M.; PEREIRA, J. O; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, v. 3, n.1, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais. In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria.** Caxias do Sul: Educs, 2002. p.269-294.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESHMUKH, S. K. (Eds.). **Fungi: multifaceted microbes.** New Delhi: Anamaya Publishers, 2007.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.

BARROS, D.I.; NUNES, H.V.; BRUNO, R.L.A.; SILVA, G.C.; ARAÚJO, E.; SOUTO, F.M. Tratamentos antifúngicos sobre a qualidade fisiológica de sementes de mangaba. In: Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, 8. 2004, João Pessoa. **Palestras e resumos.** João Pessoa: [s.n], 2004. p.148.

BATISTA, M.F. Métodos moleculares para a identificação de patógenos. **Rev. Annu. Patol. Plantas**, v.1, p.165-96, 1993.

BENETTI, S.C. et al. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.58, p. 79-83, 2009

BERNARDI-WENZEL, J.; GARCÍA, A.; FILHO, C.J.R.; PRIOLI, A.J.; PAMPHILE, J.A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). **Biological Research**. v.43, n.4, pp. 375-384, 2010.

BONFIELD, J; BEAL, K; JORDAN, M; CHEN, Y; STADEN, R. **The Staden Package Manual**, Cambridge, UK, 2006.

BOOTH, C. **The genus Fusarium**. England, p.237, 1971

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para Análise de Sementes de Espécies Florestais**. Brasília, 2013. 98p.

BRIOSIO, P.S.T.; POZZER, L.; MONTANO, H.G.; PIMENTEL, J.P.L. Uso atual e futuro da biologia molecular na fitopatologia. Parte I - aplicações em fitopatologia e vetores. In: **Revisão anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.9, p.79-119, 2001.

BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; GOTT, K.P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for Fusarium research**. Sydney, University of Sydney, p.133, 1994.

CARNEIRO, J.S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, v.11, p.557-566, 1986.

CARNEIRO, J.S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WHETZEL, M.M.V.S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p.386-394.

CARNEIRO, J. S. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba, MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 75-77, 1990.

CARNEIRO, J. G. de A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba:UFPR, 1995. 451p.

CARVALHO, P. E. R. Peroba-Rosa - **Aspidosperma polyneuron**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 12 p.(Circular Técnica, 96).

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Mclean, v.70, p.181-184, 1967.

CHARCHAR, M.J.; ANJOS, J.R.N. dos.; MELO, J.T. **Ocorrência de Phomopsis sp. em jatobá no Distrito Federal**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2002. 13p. Documentos 59.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K.F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal Basic Microbiol**, v.44, p.157-160, 2004.

DUTRA, D.C.; SILVA, M.; PEREIRA, O.L. Black mildew disease on the neotropical forest species *Aspidosperma polyneuron* in Brazil, caused by *Meliola aspidospermatis*. **Australasian Plant Disease Notes**. 2008. 3: 101-102

FERREIRA, F.A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa: UFV, SIF, 1989. 570 p.

FOULY, H.; WILKINSON, H.T.; CHEN, W. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* sp. **Mycologia**, v89, p.590-597, 1997.

FREITAS, T. M. Q.; MENEGHETTI, R. C.; BALARDIN, R. S. Dano devido à podridão vermelha da raiz na cultura da soja. **Ciência Rural**, v. 34, p. 991-996, 2004.

GARZONIO, D.M.; MCGEE, D.C. Comparison of seeds and crop residues as sources of inoculum for pod and stem blight of soybeans. **Plant disease**.v.67, p.1374-1376, 1983.

GOMES, R.R.; GLIENKE, C.; VIDEIRA, C.I.R.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CROUS, P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**.31: 1–41, 2013.

GOPAL, K.; LAKSHMI, M.; SARADA, G.; NAGALAKSHMI, T.; SANKAR, T.G.; GOPI, V.; RAMANA, K.T.V. Citrus melanose (*Diaporthe citri* Wolf): A review. **International Journal of current Microbiology and applied Sciences**.v.3, n.4, p.113-124, 2014.

HATSCHBACH, G. G.; ZILLER, S. R. **Lista vermelha de plantas ameaçadas de extinção no Estado de Paraná**. Curitiba:SEMA/GTZ, 1995. 139 p.

IPEF/EMBRAPA. **Conservação de recursos genéticos de essências florestais**: relatório final. Piracicaba-SP: IPEF, 1981. 117p.

HANLIN, R. T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE. Recife-PE. 1996. 274p.

HERNÁNDEZ, F. E.; PIOLLI, R. N.; PERUZZO, A. M.; FORMENTO, A. N.; PRATTA, G. R. Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla* de la región templada y subtropical de Argentina. **International Journal of Tropical Biology and Conservation**, v. 63, n. 3, 2015.

KAVASAKI, K.F.L.; BONALDO, S.M.; TRENTON, R.A. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em *Tectona grandis* no Brasil. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**. Alta floresta-MT, v.10, n.2, p.219-224, 2012.

KERN, M. E. e BLEVINS, K. S. **Micologia médica**. São Paulo: Premier, 1999

KLEIN, R. M. A vegetação florestal. In: BIGARELLA, J. J. **Visão integrada da problemática da erosão**. Curitiba: ADEA/IBGE, 1985. P.71-91.

KRUPPA, P.C. ; FABRI, E. G. ; RUSSOMANO, O. M. R. ; COUTINHO, L.N.. Ocorrência de *Phomopsis* sp. em Sementes de Urucum. **O Biológico**. São Paulo. v. 74, p. 55-57, 2012

LAZAROTTO, M., MUNIZ, M. F. B., SANTOS, A. F. dos. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.134-139, 2010.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F. dos; MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**. 2012. V.22, n.3, p. 493-503.

LAZAROTTO, M. MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F. dos; MEZZOMO, R.; PIVETA, G.; BLUME, E. Qualidade fisiológica e tratamentos de sementes de *Cedrela fissilis* procedentes do Sul do Brasil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 2, p. 201-210, 2013

LEITE, P. F.; KLEIN, R. M.; PASTORE, U.; COURA NETO, A. B. **A vegetação da área de influência do reservatório da Usina Hidrelétrica de Ilha Grande (PR/MS)**. (Levantamento na escala 1:250.000). Brasília: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1986. 52p.

LEITE, R.P.; MEDEIROS, J.G.F.; NASCIMENTO, L.C.; NETO, A.C.A.; GOMES, E.C.S.; MALTA, A.O. Qualidade fisiológica de sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniae foli* Benth) tratadas com extratos vegetais. **scientia plena**. v.8, n.4, 2012.

LESLIE, J.F.; SUMMERELL, B.A. **The *Fusarium* Laboratory manual**. Ames, Iowa: Blackwell Professional. p.338, 2006.

MACIEL, C.G.; MUNIZ, M.F.B.; SANTOS, A.F. dos; LAZAROTTO, M. Detecção, transmissão e patogenicidade de fungos em sementes de *Parapiptadenia rigida* (angico-vermelho). **Summa Phytopathologica**. v.38, n.4, p.323-328, 2012.

MARCONDES-FERREIRA NETO, W. ***Aspidosperma* Mart., nom. cons. (Apocynaceae): estudos taxonômicos.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1988. 452p.

MALTEZ, H.M. 1997. **Estrutura genética de *Aspidosperma polyneuron* Muell. Arg. - Apocynaceae (Peroba Rosa) em uma floresta estacional semidecidual no estado de São Paulo.** Dissertação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, BR.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico.** v.1. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17-60.

MENEZES, J.P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C.G.; Variabilidade Genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 132-139, 2010.

MONDO, V.H.V.; BRANCALION, P. H. S.; CICERO, S. M.; NOVENBRE, A. D. DA L. C.; DOURADO NETO, D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.30, n. 2, p. 177-183, 2008.

MUNIZ, M. F. B.; SILVA, L. M. e; BLUME, E. Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 140 - 146, 2007.

NASCIMENTO, W. M. O. DO; CRUZ, E. D.; MORAES, M. H. D.; MENTEN, J. O. M. Qualidade sanitária e germinação de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. (Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 28, n. 1, p. 149-153, 2006

NEERGAARD, P. **Seed pathology.** London: MacMillan, 1979. v.1, 839p.

NELSON, P.E.; TOUSON, T.A.; MARASAS, W.F.O. ***Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification.** University Park, Pennsylvania, USA, p.183, 1983.

NETTO, D. A. M.; FAIAD, M. G. R. Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v.17, n.1, p.75-80, 1995.

O'DONNELL K.; KISTLER H.C.; CIGELNIK E.; PLOETZ R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings National Academy of the Science**, USA, v.95, p. 2044-2049, 1998.

OLIVEIRA, A. K. M.; RIBEIRO, J. W. F.; PEREIRA, K. C. L.; SILVA, C. A. A. Germinação de sementes de *Aspidosperma tomentosum* Mart. (Apocynaceae) em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 3, p. 392-397, 2011.

OLIVEIRA, A.K.M; CARVALHO, J.M.B.; SOUZA, J.S.; SOUZA, S.A. Germinação de sementes de *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s.v.17, n.4, 2015.

PARISI, J. J. D. Doenças em mudas e tipos de associações entre fungos e sementes florestais. In: SANTOS, A. F. dos; PARISI, J. J. D; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo, 2011. Cap. 3, p. 37-48

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; ZAMBOLIM, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 99-112, 2004

PHILLIPS, A.J.L. The plant pathogenic genus *Phomopsis* and its teleomorph (*Diaporthe*): Development and application of morphological, biological and phylogenetic species concepts. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/personal_web_page.htm> Acesso em Janeiro de 2016.

POLETTTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; MEZZOMO, R.; RODRIGUES, J. Influência da inoculação de *Fusarium spp.* e níveis de sombreamento no crescimento e desenvolvimento da erva-mate. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 20, n. 3, p.513-521, jul. 2010.

POLETTTO, I.; LUPATINI, M.; MUNIZ, M.F.B.; ANTONIOLLI, Z.I. Caracterização e patogenicidade de isolados de *Fusarium spp.* causadores de podridão-de-raízes da erva-mate. **Floresta**. Curitiba, v.42, n.1, p.95-104, 2012

RAHALKAR, P. W.; NEEGAARD, P. Studies on aerofungin as seed treatment in controlling seed borne fungal diseases. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 11, n. 3, p. 163-165, 1969.

RAMOS, A.; BIANCHETTI, A.; MARTINS, E.G.; FOWLER, J.A.P.; ALVES, V.F.

Substratos e temperaturas para a germinação de peroba (*Aspidosperma polyneuron*). Comunicado técnico. EMBRAPA-CNPFF. Colombo, n.8, p.1, 1995.

REGO, S. S. **Germinação, morfologia e sanidade de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg e *Myrceugenia gertii* Landrum-Myrtaceae**. 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)–Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

REGO, S.S.; NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y.S.; SANTOS, A.F. dos. Germinação de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. em diferentes substratos e condições de temperaturas, luz e umidade. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.2, p.212-220, 2009.

REGO, S.S.; SANTOS, Á.F. DOS; NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y.S. Detection, transmission and pathogenicity of fungion *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg. seeds. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 34, n. 1, p 9-13, 2012.

REHNER, S. A., UECKER, F. A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Canadian Journal of Botanic**, v. 72.p.1666-1674, 1994.

RIBAS L. L. F.; ZANETTE F.; KULCHETSKI L.; GUERRA M. P. Micropropagation of *Aspidosperma polyneuron* from single node culture of juvenile material. **Revista Árvore**. 29(4): 517 – 524; 2005.

RIZZINI, C. T. Árvores e madeiras úteis do Brasil. **Manual de dendrologia brasileira**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda. 1990. 304p.

RODRIGUES, A.A.C.; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, n.5, p.532-7, 2002.

ROMEIRO, R.S.; PEREZ, F.S.; OLIVEIRA, J.R.; DEL PEROSO, M.J. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.15, n.1, p.1-5, 1993.

SALES, N. L. **Efeito da população fúngica e do tratamento químico no desempenho de sementes de Ipê-amarelo, Ipê-roxo e Barbatimão**.1992. 89 p. (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1992.

SANGER, F; NICKLEN, S; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA**. v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, A. F. dos.; PARISI, J. J. D. Características dos fungos associados às sementes florestais. In: SANTOS, A. F. dos.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo, 2011. Cap. 7, p. 87-104.

SANTOS, A. F. dos; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa - CNPF, 2011.

SANTOS, A.F. dos; GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C.G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, v.30, n.1/2, p.119-128, 2000.

SANTOS, A.F. dos; MEDEIROS, A.C.S.; SANTANA, D.L.Q. **Fungos em sementes de espécies arbóreas da mata Atlântica**. Colombo, Boletim de Pesquisa Florestal, n.42, p.51-60, jan/jun 2001.

SANTOS, M.F. **Análises da microflora associada ao baru (*Dipetryx alata* Vog.) e à caroba [(*Cybista xantisyphilitica* (Mart.)Mart.)]**. 1996. 106 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade de Brasília, Brasília.

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISAN, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A.R. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Vol.16, n. 6B, pp. 1463-1466, 2005.

SILVA, R.L.O.; LUZ, J.S.; SILVEIRA, E.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat- Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, H. S. A.; BETTIOL, W. Microrganismos Endofíticos como Agentes de Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro e de Promoção de Crescimento. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. 1. ed. São Paulo, Jaguariúna, 2009. cap. 18, p. 276 - 287.

SOUZA, L.A. de.; MOSCHETA, I.S. Morfo-anatomia do desenvolvimento do fruto e da plântula de *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 38., 1987, São Paulo. **Resumos**. São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil / Universidade de São Paulo, 1987. p.345.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE JUNIOR, J.F. Endophytic fungi. In: MUELLER, J.M.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. San Diego: Elsevier Academic Press, p.241-70, 2004.

STRAPASSON, M.; SANTOS, A.F. dos; MEDEIROS, A.C. de S. Fungos associados às sementes de angico (*Piptadenia paniculata*). **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n.45, p.137-141, jul/dez. 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**. v. 24, p. 1596-1599, 2006.

TAYLOR, T.N.; TAYLOR, E.L. The rhyniechert ecosystem: a model for understanding fungal interactions. In: BACON, C.W.; WHITE, J.F. (Ed.). **Microbial endophytes**. New York: Marcel Decker, 2000.

UECKER, F.A. A World list of *Phomopsis* names with notes on nomenclature, morphology and biology. **National Fungus Collection**, v. 13, 1988.

VECHIATO, M.H.; PARISI, J.J.D. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. **Biológico**, São Paulo, v.75, n.1, p.27-32, 2013

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredados. I – história, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 271-298, 1999.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Eds.) **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SHINSKY, J. J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. Academic Press, San Diego, 1990, p. 315–322.

WALKER, C.; MACIEL, C.G.; BOVOLINI, M.P.; POLLET, C.S.; MUNIZ, M.F.B. Transmissão e patogenicidade de *Phomopsis* sp. associadas às sementes de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* Benth). **Floresta e ambiente**.v.20, n.2, 2013.

WINDELS, C.E. Economic and social impacts of *Fusarium* head blight: changing farms and rural communities in the northern Great Plains. **Phytopathology**. v.90, p.17-21, 2000.